



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.

CAMPO DEL CONOCIMIENTO: CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
CAMPO DISCIPLINARIO: BIOLOGÍA BUCAL

TÍTULO DEL PROYECTO:

Construcción de una plataforma vibratoria para el estudio del efecto de las vibraciones mecánicas sobre la viabilidad y diferenciación de células troncales mesenquimales.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
Casandra Alí Ríos García

Tutora: Dra. Patricia González Alva
Facultad de Odontología

Comité tutor:
Dra. Ana Lilia García Hernández
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Vo.Bo.
[Firma manuscrita]

Ciudad Universitaria, CDMX, noviembre 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**
(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción 1 y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado "Construcción de una plataforma vibratoria para el estudio del efecto de las vibraciones mecánicas sobre la viabilidad y diferenciación de células troncales mesenquimales" que presenté para obtener el grado de Maestría en Ciencias es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Casandra Alf Ríos García

Número de cuenta: 311088205

Dra. Patricia González Alva

Vo. Bo. Tutor principal

Agradecimientos

Al laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la División de estudios de posgrado e investigación, de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas de sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-IN223521) por otorgar el financiamiento para la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca de manutención otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la Dra. Patricia González Alva por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su dirección.

A la Dra. Ana Lilia García Hernández y al Dr. Isaac Obed Pérez Martínez por sus valiosas aportaciones a este proyecto.

A los integrantes del laboratorio de acústica y vibraciones; Dr. Felipe Orduña Bustamante, Ing. Ricardo Dorantes Escamilla y M. en I. Antonio Pérez López, por su asesoría y participación en la caracterización de la plataforma vibratoria fabricada en esta investigación.

A mis padres y a mi familia, que me han impulsado para alcanzar cada una de mis metas.

A Pedro Lara Fuentes, por ser un compañero extraordinario durante esta etapa.

Contenido

Agradecimientos	3
Resumen.....	5
Summary	7
Introducción	9
Justificación	11
Objetivos	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos.....	13
Hipótesis.....	13
Capítulo 1. Antecedentes y planteamiento del problema	15
1.1. Mecanobiología.....	15
1.2. Terapia vibratoria	17
1.3. Dispositivos para estimulación vibratoria.....	20
Capítulo 2. Metodología.....	24
Capítulo 3. Resultados.....	31
Capítulo 4. Discusión	41
Conclusiones y perspectivas.....	46
Referencias bibliográficas	48
Anexos.....	53
I. Glosario	53
II. Ensayos y técnicas.....	54
Viabilidad celular	54
Tinción de Alizarina Roja	54
Tinción de rojo oleoso.....	55
III. Tablas	56

Resumen

El presente proyecto tiene como objetivo diseñar, construir y validar una plataforma vibratoria personalizada, que permitirá investigar el impacto de las vibraciones mecánicas en el comportamiento de las células troncales mesenquimales (MSC) derivadas del tejido gingival. La construcción de esta plataforma fue crucial para avanzar en el entendimiento de cómo las fuerzas biomecánicas afectan el crecimiento y la diferenciación de las MSC, conocimiento que a su vez puede tener implicaciones significativas en la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos aplicados a las patologías de cabeza y cuello. Este proyecto se realizó en colaboración con expertos en ingeniería, en biología celular y molecular, con la finalidad de generar conocimiento que contribuya al avance de la investigación biomédica.

La estrategia metodológica comenzó con el ensamblaje de la plataforma, para posteriormente caracterizar los parámetros de amplitud y frecuencia, en la generación de ondas sinusoidales.

El modelo biológico utilizado fue la línea celular troncal mesenquimal derivada de tejido gingival (TG-MSC), la cual fue sometida a un régimen de estimulación vibratoria, de 20 y 60 Hz por 20 minutos cada tercer día, bajo condiciones estándares de cultivo de 37°C y 5% de CO₂ utilizando un medio control (medio basal) y un medio experimental (osteogénico). Con estos parámetros se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de resazurina a los 7, 14 y 21 días de cultivo. Para confirmar la diferenciación osteogénica, se utilizó la tinción de alizarina roja a los mismos tiempos de cultivo. Finalmente, se extrajo el colorante de alizarina para su medición mediante una técnica espectrofotométrica.

Con base a los resultados se observó que la plataforma mostró aceleraciones en promedio para X de -2.36 cG, para Y de 3.25 cG, y para Z de 68.18 cG; con un desplazamiento de hasta 7.4 μm , utilizando frecuencias de 20 y 60 Hz. Los resultados de la caracterización demostraron la eficiencia de la plataforma para generar ondas sinusoidales de baja magnitud ($< 1g$, $g = 9.8 \text{ ms}^{-2}$) y alta frecuencia ($> 30\text{Hz}$).

Como primer paso para comprender el efecto de la aplicación de señales mecánicas sobre las TG-MSC, los cultivos celulares se colocaron sobre la plataforma vibratoria bajo estimulación de 20 y 60 Hz, con una amplitud máxima de 7.4 μm durante 20 minutos cada tercer día durante 7, 14, y 21 días consecutivos, en ausencia o presencia de inductores bioquímicos de osteogénesis. El grupo de control se colocó en el medio de cultivo basal u osteogénico sin estimulación mecánica.

En los tiempos establecidos se midió la actividad metabólica, y la presencia de depósitos de calcio mediante la tinción de alizarina roja, y se realizó la cuantificación de estos por espectrofotometría. Para descartar la acumulación de depósitos de lípidos y la

diferenciación hacia el linaje adipogénico, se realizó la tinción de rojo oleoso a los 21 días de cultivo. Los resultados se expresaron como el promedio de tres diferentes experimentos, y se analizaron mediante el software estadístico de GraphPad Prism Versión 10.0.0 (131), para el análisis estadístico se realizó una prueba de normalidad de Shapiro Wilk y una T de Student para las comparaciones entre grupos, considerando una $P \leq 0.05$ como significativa.

Las evaluaciones de la viabilidad celular en diferentes puntos de tiempo probaron que los efectos de la vibración dependen en gran medida de la fase de diferenciación en la que se encuentren las células, misma que a su vez fue guiada con el uso o la ausencia de un medio inductor, pues se observó que durante los primeros 14 días las vibraciones disminuyen la viabilidad de los grupos experimentales por debajo del porcentaje del grupo control, sin embargo, al prolongar la exposición a las vibraciones, la viabilidad se restaura por encima del grupo control, tanto en las células con medio inductor como en las células con un medio basal. A su vez, las vibraciones aumentaron el depósito de calcio en la matriz extracelular de los grupos con o sin medio inductor, esto por encima del grupo control, actividad que asocia con proceso de diferenciación hacia el linaje óseo.

Para esclarecer la forma en la que las vibraciones mecánicas dirigen el destino de las células troncales mesenquimales, se requieren más estudios en los que se prueben diferentes parámetros de vibración bajo distintas condiciones de cultivo, pero sobre todo se requiere el desarrollo de nuevos dispositivos que no sólo generen los estímulos, sino que además integren sensores que monitoreen condiciones como pH, temperatura, oxígeno, e incluso la secreción de proteínas o pequeñas moléculas.

Summary

In this project, a customized vibration platform was built and validated to explore the effects of mechanical vibrations on the behavior of mesenchymal stem cells, especially those from gingival tissue. The equipment proposed in this research is essential to improve the knowledge of how mechanical forces influence the essential processes of cellular proliferation and differentiation.

A device with specific amplitude and frequency parameters assembled and characterized for sine wave production was assembled. Once the validation phase was concluded, a line of gingival derived mesenchymal stem cells (GF-MSC) was subjected to a vibration regime of 20 and 60 Hz, for 20 minutes every other day, in standard and osteogenic conditions.

As part of a first approach to the compression of the effects of mechanical signals on GF-MSC, the cells of the experimental groups were subjected to vibration regimes at 20 and 60 Hz, for 20 minutes every third day for 7, 14, and 21 consecutive days, in the absence or presence of biochemical inducers of osteogenesis. The cells from the control groups were only placed on the platform.

After 7, 14, and 21 days, viability was analyzed with the resazurin assay method. The alizarin red stain was used to verify the osteogenic induction. In addition, the Ca accumulation assay was performed.

The results of the platform characterization showed average accelerations for X of -2.36 cG, for Y of 3.25 cG, and for Z of 68.18 cG; and with a displacement of up to 7.4 μm , using frequencies of 20 and 60 Hz. It was through this characterization that the efficiency of the platform to generate sine waves of low magnitude ($<1g$, $g = 9.8 \text{ ms}^2$) and high frequency was demonstrated. ($>30\text{Hz}$).

The results of the resazurin assays and staining to evaluate differentiation showed that during the first 14 days, the viability of the experimental groups decreased compared to the control groups. However, after 21 days, cell viability increased in the experimental groups compared to the control group, regardless of whether the inducing or basal culture medium is used. In the same way, the vibrations increased calcium deposits, which was related to the differentiation process towards the bone lineage.

With all the above, it was proven that the effects of vibration on the viability and differentiation of MSCs depend mainly on the differentiation phase in which the cells are found. In turn, this phase is accelerated by an inducing medium.

To the best of our knowledge, this is the study to explore the effects of mechanical stimulus in MSC derived from dental tissues.

More studies are required to clarify how mechanical vibrations direct the fate of mesenchymal stem cells, in which different vibration parameters are tested under different culture conditions.

The development of new devices is required to generate controlled stimuli, and the integration of sensors that monitor conditions such as pH, temperature, oxygen, and even the secretion of proteins or small molecules will be necessary.

Introducción

La investigación en biología celular y molecular ha avanzado significativamente en las últimas décadas, brindando un entendimiento más profundo de los procesos celulares y sus aplicaciones potenciales en medicina regenerativa. Entre los descubrimientos más intrigantes se encuentra el papel de las vibraciones mecánicas en el comportamiento y la diferenciación de células troncales mesenquimales (MSC) (Marycz et al., 2016).

En el caso particular de la odontología, el conocimiento disponible sobre la estimulación vibratoria ha permitido la creación de dispositivos comerciales como AcceleDent (OrthoAccel Technologies, Inc. Houston, TX), el cual es una herramienta de ortodoncia empleada para acelerar el proceso de alineación durante el tratamiento de ortodoncia convencional con aparatología fija, es decir, brackets, y cuyo funcionamiento, se basa en un concepto llamado “microvibraciones” u “oscilaciones de baja frecuencia”.

La teoría detrás de AcceleDent es que estas microvibraciones estimulan a las células del hueso alrededor de las raíces de los dientes, y se cree que esta estimulación a nivel biológico puede acelerar la remodelación ósea, lo que a su vez permite que los órganos dentarios se muevan más rápido y de manera más eficiente a la posición deseada.

Aunado a la implementación de las vibraciones a nivel clínico, se ha propuesto la estimulación vibratoria en el desarrollo de estrategias de medicina regenerativa, donde además se ha adoptado el uso de células troncales mesenquimales (MSC), debido a su capacidad proliferativa y de autorrenovación, así como su capacidad multipotente que les permiten diferenciarse y dar origen a tejido óseo, muscular, cartilaginoso y tejido adiposo (Woloszyk et al., 2016). Por lo tanto, en este proyecto, se propone la construcción de una plataforma vibratoria como una herramienta esencial para investigar el impacto de las vibraciones mecánicas en las MSC (Ye et al., 2022).

En general, se considera que, en su entorno fisiológico la población de MSC que reside en cada tejido se encuentra expuesta a estímulos bioquímicos y mecánicos que dirigen su comportamiento e influyen sobre el compromiso de las células hacia determinada estirpe. Por el contrario, para lograr la diferenciación en ensayos *in vitro*, se emplean métodos químicos basados en la adición de factores de crecimiento que han sido ampliamente estudiados y que aseguran el éxito en el establecimiento de un linaje celular (English & Mahon, 2011).

Partiendo del conocimiento sobre la capacidad de las MSC para detectar y responder a cargas mecánicas, se ha propuesto la estimulación mediante vibraciones o ensayos de tracción, como una alternativa para dirigir su diferenciación.

A pesar de que la vibración no es estrictamente una condición de carga que se experimente naturalmente, se ha elegido como una representación de la tensión cíclica que ejercen los músculos en los huesos, cuando se realizan actividades físicas o simplemente se mantiene el control postural (Edwards & Reilly, 2015).

Ensayos *in vivo* con vibraciones de cuerpo completo, han estudiado los efectos de este tipo de estimulación sobre el aumento de la masa ósea, de forma paralela se han desarrollado estudios *in vitro* que exploran específicamente la respuesta de las MSC a la vibración (Song et al., 2011).

Se han probado diferentes magnitudes y frecuencias para estimular la diferenciación principalmente a células formadoras de tejido óseo, sin embargo, los parámetros que se emplean para cada estudio difieren marcadamente entre la duración de la estimulación vibratoria, así como en los rangos de frecuencia que utilizan. Aunado a la falta de establecimiento de parámetros óptimos para establecer determinado linaje celular, el mecanismo de mecanotransducción y sus implicaciones en la activación de éstas múltiples vías permanecen en incertidumbre.

En un intento por lograr una mayor aproximación al entorno fisiológico de las MSC, y con ello obtener un conocimiento más profundo de su comportamiento bajo distintas condiciones mecánicas, las investigaciones más recientes han optado por realizar cultivos celulares en 3D.

Pese a que existen numerosos reportes en los que se estudian los efectos de la vibración mecánica sobre las MSC, este campo de estudio permanece poco explorado en odontología, y aunque la diferenciación osteogénica ha acaparado la mayoría de las investigaciones, es necesario mirar hacia otras posibles rutas de diferenciación que podrían activarse o inhibirse mediante la estimulación vibratoria, para comenzar a explotar estos conocimientos en la creación de estrategias dirigidas a la regeneración tisular, o a la respuesta rápida de la adaptación de los tejidos dentales.

Por lo todo lo anterior, la construcción de una plataforma vibratoria con parámetros bien establecidos es esencial para estudiar el efecto de las vibraciones mecánicas en el crecimiento y la diferenciación de células troncales mesenquimales. Es así como, la plataforma vibratoria propuesta en el presente proyecto representa una herramienta multidisciplinaria que brinda la oportunidad de comprender mejor los procesos celulares de las MSC, lo cual tiene un gran potencial en la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos aplicada a la odontología.

Justificación

Actualmente se sabe que las células responden a su entorno físico a través de la mecano transducción, y que a su vez esta dinámica modula funciones como la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis, sin embargo, aún se desconocen un gran número de moléculas o componentes que participan en este proceso y no se han identificado todas las vías de señalización que están involucradas, de igual forma, tampoco se ha dilucidado cómo el alterar la integración de estos estímulos, conduce al desarrollo de enfermedades como distrofias musculares y cardiomiopatías e incluso progresión y metástasis de cáncer.

Las células troncales mesenquimales (MSC), son de gran interés en el campo de la medicina regenerativa debido a su capacidad para autorrenovarse y diferenciarse en múltiples tipos celulares. Por ello, comprender cómo las fuerzas mecánicas, como las vibraciones, afectan a las MSC tiene el potencial de abrir nuevas estrategias terapéuticas para la regeneración de tejidos y la reparación de lesiones.

Actualmente en odontología se utilizan dispositivos vibratorios en la práctica clínica, como AcceleDent, el cual es un dispositivo pequeño y liviano que se asemeja a una boquilla. La teoría detrás de AcceleDent se basa en la utilización de fuerzas vibratorias de baja frecuencia de aproximadamente 30 Hz, que estimulan la diferenciación y maduración celular, lo que conduce a una remodelación ósea y un movimiento dental más rápido. Aunque varios estudios describen tasas prometedoras de movimiento dental durante el tratamiento de ortodoncia coadyuvado con la aplicación de fuerzas vibratorias en humanos, lo cierto es que estudios sobre el estímulo vibratorio y sus efectos en células mesenquimales derivadas de tejidos dentales, y encargadas del proceso de remodelación ósea, siguen siendo escasos.

Para contribuir al conocimiento sobre la influencia de la estimulación mecánica en el comportamiento celular, es indispensable contar con dispositivos apropiados para generar estímulos vibratorios controlados donde las oscilaciones sean estables, medibles y replicables. Asimismo, es deseable que su configuración y funcionamiento sean amigables y poco confusos hacia el operador. Por lo tanto, con la fabricación de una plataforma vibratoria, específicamente diseñada para su implementación en un cultivo celular, se cumpliría el propósito anterior y una vez validado el funcionamiento del dispositivo, sería posible emplearlo para estudiar sus efectos sobre los cultivos celulares.

Comprender cómo las vibraciones mecánicas impactan en las MSC podría tener aplicaciones clínicas significativas. Esto podría incluir terapias regenerativas más efectivas, rehabilitación después de lesiones o cirugías, y estrategias para mejorar la calidad de la producción de células para terapias basadas en MSC.

Evaluar diferentes parámetros de frecuencia vibratoria en un estudio con condiciones de cultivo homogéneas, proporcionará un conocimiento sólido para establecer o determinar qué rango de frecuencia tiene un efecto positivo sobre la viabilidad de las células troncales mesenquimales, y así mismo, se podrá identificar cuál de todos estos parámetros tiene un efecto más significativo sobre la diferenciación de dichas células hacia el linaje osteogénico. Por ello, este proyecto contribuirá al avance de la investigación básica en biología celular y molecular al proporcionar información sobre cómo las células troncales responden a estímulos mecánicos. Estos conocimientos pueden tener implicaciones más allá de las MSC y aplicarse a otros tipos celulares y sistemas biológicos.

En un contexto terapéutico, la estimulación vibratoria como inductora del proceso de osteogénesis, puede concebirse como una opción eficiente y poco invasiva, capaz de activar la formación de tejido óseo, y de acuerdo con las conclusiones de diversos estudios, esta activación representa una mejoría en la salud de los pacientes con osteoporosis u osteopenia. Sin embargo, la aplicación de esta terapia vibratoria no se limita únicamente a revertir los efectos de estas enfermedades, puesto que la inducción hacia células formadoras de hueso podría emplearse como una alternativa novedosa ante el uso de moléculas inductoras que se utilizan cotidianamente en los cultivos celulares *in vitro*, cuya aplicación es principalmente la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos.

Por todo lo anterior, la construcción de la plataforma vibratoria representa el primer paso en el estudio de la estimulación mecánica y sus efectos a nivel celular, y su fabricación requiere la colaboración entre expertos en ingeniería y biología celular. Esta sinergia interdisciplinaria fomentará la innovación y la resolución de problemas complejos. Los resultados de este proyecto tienen el potencial de generar nueva información científica que puede ser publicada en revistas especializadas, lo que contribuirá al conocimiento científico en el campo de la biología celular y la medicina regenerativa.

En resumen, la justificación de este proyecto radica en su capacidad para llenar un vacío en la investigación biomédica al proporcionar una herramienta personalizada y controlable para estudiar cómo las vibraciones mecánicas influyen en el comportamiento de las MSC derivadas de tejidos dentales. Este conocimiento tiene el potencial de tener un impacto positivo tanto en la investigación básica como en las aplicaciones clínicas relacionadas con la medicina regenerativa y la terapia celular.

Objetivos

Objetivo General

Construir un dispositivo emisor de vibración con parámetros validados que permita investigar de manera precisa y controlada cómo las vibraciones mecánicas influyen en el crecimiento y la diferenciación de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC).

Objetivos Específicos

1. Fabricar una plataforma vibratoria personalizada que genere vibraciones mecánicas controladas en términos de frecuencia y amplitud.
2. Realizar pruebas de funcionamiento y calibración como parte de la caracterización, para asegurar que las vibraciones producidas por la plataforma sean precisas y reproducibles.
3. Establecer cultivos celulares de células troncales mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC) en condiciones controladas para garantizar la uniformidad de los experimentos.
4. Utilizar la plataforma vibratoria para exponer las células troncales mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC) a vibraciones mecánicas a diferentes frecuencias.
5. Medir la viabilidad de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC) después de la exposición a las vibraciones mecánicas y compararla con un grupo de control no expuesto.
6. Investigar cómo las vibraciones mecánicas afectan la diferenciación de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC) en un linaje celular específico, el osteogénico.

Pregunta de investigación

¿Tendrá la estimulación vibratoria algún efecto sobre la viabilidad celular o la diferenciación de células troncales mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC)?

Hipótesis

La exposición controlada de las células troncales mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC) a las vibraciones mecánicas específicas, generadas por la plataforma

vibratoria, promoverá el crecimiento celular y/o influirá en la diferenciación celular hacia el linaje osteogénico de manera significativa.

Capítulo 1. Antecedentes y planteamiento del problema

1.1. Mecanobiología.

En el transcurso de las últimas décadas han emergido proyectos con métodos enfocados a incrementar la capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación del hueso (Ciombor & Aaron, 2005; Mehta et al., 2018; Mobini et al., 2017; Simmons et al., 2003). Estos métodos incluyen principalmente, la estimulación de la población de células mesenquimales mediante su exposición a campos magnéticos estáticos, corrientes eléctricas y la estimulación por vibración tanto pulsada como continua (Marędziak et al., 2017).

Con relación al fenómeno vibratorio, se ha descrito que este ocurre de manera natural cuando los músculos trabajan, por ejemplo, al someterse a una rutina de ejercicio, la cual impacta no solo en el aumento de la masa muscular sino también en la masa mineral ósea, y el tamaño y propiedades estructurales de esqueleto.

En particular las vibraciones que ocurren naturalmente han sido objeto de investigación en las últimas décadas para obtener avances significativos sobre la fisiología del cuerpo humano y debido a la importancia de las interacciones mecánicas en el comportamiento celular, la mecanobiología ha surgido como un campo de estudio donde se combinan los principios de biología, mecánica e ingeniería, con la intención de comprender la dinámica que permite a las células interpretar y responder a la información mecánica proveniente de su entorno (Lim et al., 2010).

La “*mecanotransducción*”, es el proceso en el cual las células transforman esa información mecánica en un mensajero bioquímico para transmitirla hasta el núcleo (Maurer & Lammerding, 2019). Durante la detección de estos estímulos mecánicos, participan una serie de moléculas denominadas “*mecanosensores*”, que atraviesan la membrana celular y establecen un vínculo entre la matriz extracelular (MEC) y los componentes del citoesqueleto. Las adhesiones focales, los canales iónicos activados por estiramiento, los receptores acoplados a proteínas G y los receptores de factores de crecimiento, son solo algunos de los elementos transmembranales que responden a la carga mecánica (Martino et al., 2018).

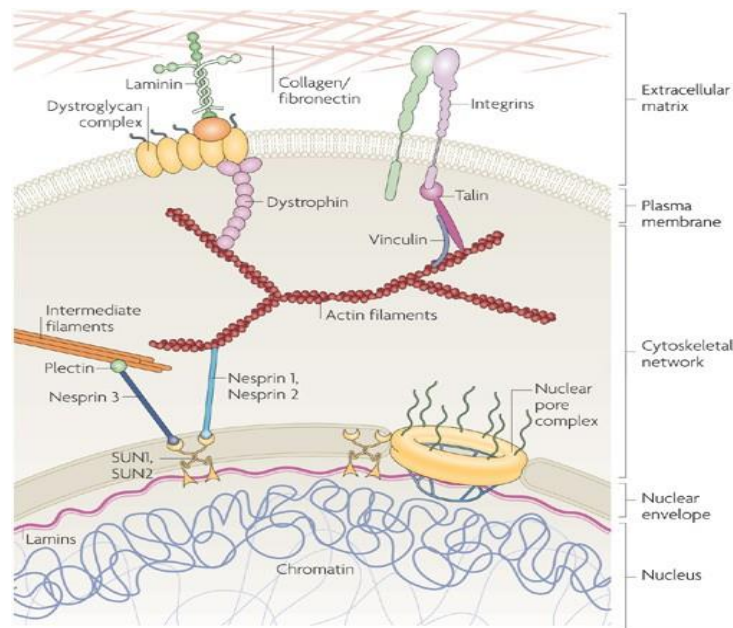
Aunque tradicionalmente se consideraba a la MEC como una red tridimensional que solo proporcionaba soporte estructural a las células, una concepción más actual, señala que su composición y remodelación son factores que influyen directamente en procesos como la migración, y que también este armazón, participa activamente en la amortiguación de estímulos biofísicos y su transmisión directamente a las células (Yue, 2014).

Durante la difusión de una señal mecánica al interior de una célula, participan los complejos multiprotéicos denominados adhesiones focales, estas constituyen el eje

principal de la interacción célula-MEC, pues están compuestas por moléculas como las integrinas, que se vinculan a los elementos de la MEC y también de proteínas acopladoras como: la vinculina, talina, paxilina y quinasas de adhesión focal, que se anclan a los filamentos de actina del citoesqueleto (Stewart et al., 2020).

A nivel de estructuras más organizadas y complejas, se puede asumir que las vibraciones mecánicas también son capaces de estimular a las fibras musculares, tendones y huesos, generando una serie de respuestas fisiológicas. Entre ellas, se incluye la activación de los reflejos miotáticos, que provocan contracciones musculares involuntarias, además de influir en la circulación sanguínea, la densidad ósea y la liberación de hormonas (Baskan et al., 2017)

La figura 1.1. muestra algunas de las proteínas involucradas en la mecanotransducción e ilustra la fisiología fundamental y los mecanismos que generalmente ocurren para inducir la adaptación de una célula después de la aplicación del estímulo físico.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1.1. Transmisión de la fuerza entre la matriz extracelular y el núcleo (Jaalouk & Lammerding, 2009). Las fuerzas se transmiten desde el exterior a través de la unión proteínas específicas de la MEC con las proteínas de adhesión focal, el estímulo se traduce a través de los microfilamentos y proteínas estructurales del citoesqueleto, y así la información mecánica se propaga hasta el núcleo, donde finalmente desencadenará la expresión o inhibición de genes relacionados con la migración, la proliferación o algún proceso metabólico.

Una vez que el proceso de mecanotransducción ha sido inducido por un cambio conformacional en la estructura de las integrinas, los microtúbulos y los filamentos intermedios, en conjunto con los filamentos de actina, actúan como segundos mensajeros que a través de modificaciones en su geometría y polaridad, transmiten las fuerzas hasta el núcleo y simultáneamente inducen cambios en la configuración de las proteínas localizadas en el citoplasma para generar igualmente su translocación al núcleo (Szczyzny & Mauck, 2017).

Se ha propuesto que, en una etapa final, la integración de los estímulos biofísicos se completa con la activación de un programa genético en el que selectivamente se activan o reprimen genes que le permiten a célula adaptarse a las nuevas condiciones de su entorno (Martino et al., 2018).

Sobre la respuesta que surge después de integrar los estímulos mecánicos, Nikukar y colaboradores han propuesto que particularmente las señales sinusoidales a nanoescala, llamadas por ellos “nanockiging” (desplazamientos de 10 a 14 nm a 1 kHz), promueven la osteoblastogénesis en cultivos de células troncales mesenquimales humanas (Nikukar et al., 2013).

1.2. Terapia vibratoria

Partiendo de las observaciones acerca de la capacidad de los huesos, para adaptar su forma y resistencia, a las demandas funcionales resultantes de la locomoción o el ejercicio de alta intensidad, surgieron los primeros estudios sobre los efectos de la carga mecánica inducida sobre este tejido (Haffner-Luntzer et al., 2016).

Con el aumento en la incidencia de enfermedades y lesiones que afectan al sistema musculoesquelético, se tornó indispensable la creación de terapias seguras, sencillas y eficaces, para mejorar su funcionamiento o reestablecer su salud; y ya que algunas actividades representaban un riesgo para los pacientes con afectaciones al tejido óseo, comenzaron a explorarse distintas intervenciones de activación física para estos pacientes (Rubin et al., 2006).

A pesar no ser una condición que se experimente naturalmente en el cuerpo, se propuso que las vibraciones de baja magnitud y alta frecuencia o LMHFV por sus siglas en inglés, podían emplearse para generar fuerzas de corta duración en el sistema estructural, similares a las que generan los músculos en el hueso (Gilsanz et al., 2006).

Para su implementación a nivel clínico, se fabricaron dispositivos capaces de generar LMHFV, y se aplicaron en protocolos de terapia vibratoria de cuerpo completo. Los resultados de estos estudios clínicos sugieren que las LMHFV generan efectos positivos sobre la densidad mineral ósea, grosor trabecular, espacio intertrabecular, tasa de

formación ósea, mantenimiento de equilibrio y postura, así como una disminución en la probabilidad de caídas (Chow et al., 2020; Edwards & Reilly, 2015; Rubin et al., 2006; Slatkowska et al., 2010).

Así mismo, los resultados también sugerían que las LMHFV tenían un efecto anabólico en el hueso de pacientes con osteoporosis (Shi et al., 2010). En otro estudio enfocado a estudiar el impacto de las LMHFV vibraciones sobre la curación de fracturas osteoporóticas en modelos animales, los resultados mostraron que las LMHFV mejoran el tiempo de consolidación de fracturas, y aumenta la expresión de genes relacionados con el proceso de formación ósea, acelerando así, la formación del callo óseo y el proceso de mineralización (Chung et al., 2014).

En el caso de los estudios *in vitro*, se ha estudiado el efecto de la estimulación vibratoria en osteoblastos, osteocitos, y osteoclastos con diferentes frecuencias de vibración (Gao et al., 2016; Gao et al., 2017; Lau et al., 2010; Steppe et al., 2021). La variabilidad entre los parámetros utilizados, como el tiempo de exposición, la periodicidad, la magnitud y la frecuencia de cada protocolo, dificulta la obtención de conclusiones definitivas, sin embargo, los estudios realizados con MSC sugieren que magnitudes por debajo de 1 g ($<1g$, $g = 9.8 \text{ m/s}^2$) y frecuencias entre los 20 y 100 Hz estimulan su diferenciación hacia el linaje osteogénico (Edwards & Reilly, 2015; McClarren & Olabisi, 2018).

La evidencia sugiere que las LMHFV tienen un efecto en las MSC, y que la carga mecánica podría guiar su compromiso hacia el linaje óseo, aumentar su proliferación e incluso influenciar su potencial osteogénico previo a la inducción con medios químicos. Igualmente, el análisis de la expresión génica indica que las vibraciones en frecuencias menores a 100 Hz aumentan la expresión de genes ALP, OCN, OPN, Rux2, entre otros, característicos de la diferenciación osteogénica (Kim et al., 2013; Styner et al., 2014; Uzer et al., 2013). La Tabla 1.1 enlista los ensayos que han empleado la estimulación vibratoria en MSC.

Si bien, existe un interés creciente en el uso de LMHFV como terapia para mejorar la estructura ósea y el rendimiento muscular, la dinámica molecular que subyace a la diferenciación de las MSC permanece aún incomprendida en su totalidad, además se requieren nuevos estudios para establecer una ventana de frecuencias óptimas que dirijan la osteogénesis (Steppe et al., 2021).

Tabla 1.1 Ensayos de LMHFV con células troncales mesenquimales

Línea celular	Protocolo de vibración	de	Resultados	Autor
Células troncales mesenquimales de rata	60 Hz, 0.3 g, 1 hora durante 6 días		Disminución en la expresión de Osterix y en la mineralización de la matriz extracelular	Lau et al.,2011
Células troncales mesenquimales humanas	30-40 HZ,0.3 g, 10 minutos durante 5 días		Aumento en la expresión de Osteoprotegerina, Colágeno tipo I y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Kim et al.,2012
Células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo	30 y 100 Hz, 0.15 , 1 y 2 g, durante 14 días		Aumento en la proliferación, la mineralización de la matriz extracelular y la remodelación del citoesqueleto	Uzer et al.,2013
Células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo	25, 35 y 45 Hz, 0.3 g, 15 minutos durante 14 días		Aumento en la expresión de marcadores osteogénicos y condrogénicos Inhibición de la adipogénesis	Marycz et al.,2016
Células troncales mesenquimales de rata	40 Hz. 0.3g, 15 minutos al día		Aumento en la proliferación, la mineralización de la matriz extracelular y la expresión de	Lu et al.,2018

				marcadores de osteogénesis	
Células troncales mesenquimales de médula ósea de ratón	90 Hz,0.1g, minutos al durante 7 días	15 días	Disminución en la expresión de marcadores de adipogénesis, Aumento en la expresión de marcadores osteogénicos		Baskan et al.,2017

I.3. Dispositivos para estimulación vibratoria

Los primeros ensayos sobre mecanotransducción emplearon técnicas que pretendían imitar la complejidad del entorno fisiológico en el que residen las células, tal fue el caso de los cultivos en 3D, y los cultivos con sustratos de composición o rigidez similares a la MEC (Zhang et al., 2017) (Uto et al.,2017).

Conscientes de que, en el contexto celular, los estímulos se presentan de forma pasiva pero también activa, los investigadores, a la par del estudio de las vibraciones, enfocaron su atención en la creación de dispositivos capaces de proporcionar estas fuerzas externas de forma constante y cíclica (Dhowre, et al.,2015).

Hoy en día, la vibración no es la única condición estos dispositivos pueden replicar, puesto que se han fabricado instrumentos que producen tensión, compresión, flexión y estrés cortante, bajo parámetros muy similares a los que experimentan las células. Al ser una herramienta indispensable en la investigación sobre mecanobiología, el número de reportes sobre la fabricación y el diseño de estos instrumentos ha crecido exponencialmente, y tal es el caso, que algunos dispositivos se encuentran disponibles comercialmente y otras patentes siguen en revisión (Melo et al.,2023).

Pese a la disponibilidad de estos instrumentos, en la mayoría de las investigaciones sobre vibración, se ha optado por producir “plataformas” que satisfacen las necesidades particulares de cada protocolo, y que además superan las limitantes relacionadas con las dimensiones de los equipos comerciales y los costos asociados a estos (Fig. 1.2 y 1.3). Así mismo, con los dispositivos personalizados, se ha resuelto la constante preocupación de garantizar condiciones asépticas durante los ensayos, ya que se requiere que sus componentes se ensamblen dentro de una cabina de seguridad o permitan su esterilización

(Fig. 1.4), y por supuesto que se puedan trasladar al interior de una incubadora para llevar a cabo el experimento (Campsie et al., 2019; Dhowre et al., 2015; Melo-Fonseca et al., 2023).

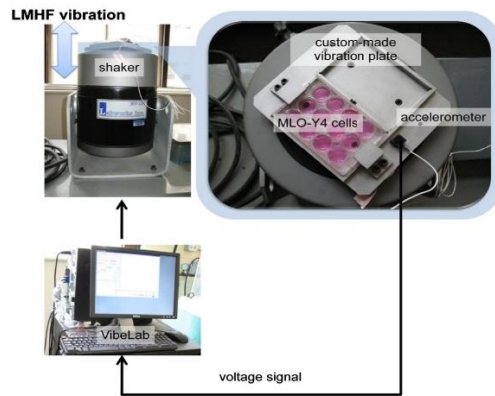


Figura 1.2 Placa vibratoria adaptada a un agitador para la generación de vibraciones (Lau et al., 2010).

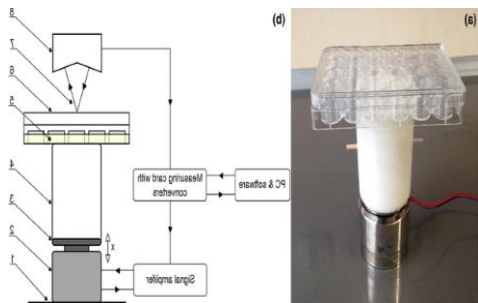


Figura 1.3 Diagrama y componentes de un generador de vibraciones (Marędziaik et al., 2017).

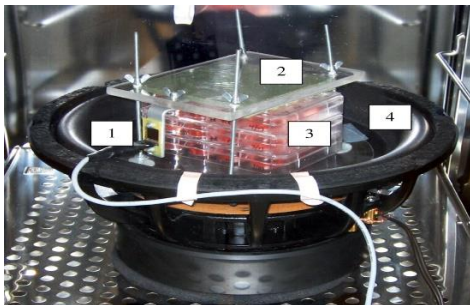


Figura 1.4 Plataforma para vibración de cultivos celulares (Tirkkonen et al., 2011).

Con relación al campo clínico de la odontología han aparecido dispositivos que permiten aplicar la terapia vibratoria, por ejemplo, el dispositivo AcceleDent (OrthoAccel Technologies, Inc. Houston, TX) se introdujo en el área de ortodoncia en el 2009 para reducir los tiempos de los tratamientos ortodónticos (Reiss et al., 2020).

Este tipo de dispositivos son pequeños y livianos, semejantes a una boquilla, que el paciente coloca en la boca y lo sujeta entre los dientes, aplicando una ligera presión para asegurarse de que esté bien ajustado. La boquilla a su vez emite microvibraciones o pulsaciones de baja frecuencia que son transmitidas a los dientes. Estas vibraciones son extremadamente suaves y generalmente no causan molestias ni dolor (Bakdach & Hadad, 2020; Katchooi et al., 2018).

La teoría de este dispositivo sugiere que, las fuerzas vibratorias de aproximadamente 30 Hz estimulan la diferenciación y maduración celular, lo que lleva a una remodelación ósea y a un movimiento dental más rápido (Bakdach & Hadad, 2020).

El tiempo de uso recomendado por el fabricante es de 20 minutos al día, diariamente durante el tratamiento de ortodoncia (Reiss et al., 2020). Los efectos en el hueso, aparentemente, son análogos a una lesión local, similar a la creación de microfracturas en el hueso alveolar, pero de una forma menos invasiva.

I.4. Planteamiento del problema

Como se ha descrito hasta el momento, avances significativos en diversos campos tecnológicos y de investigación han contribuido a hallazgos notables sobre la dinámica fisiológica del cuerpo humano. Actualmente existen dispositivos disponibles para el estudio de la estimulación mecánica, sin embargo, existen características generales de los dispositivos que podrían configurarse a las necesidades de cada grupo de investigación para realizar estudios mecanobiológicos más fiables y precisos.

Partiendo del conocimiento acerca de la capacidad del tejido óseo para responder a los componentes mecánicos de su entorno, se han desarrollado numerosas investigaciones con la intención de comprender cómo las células que integran este tejido detectan estímulos como la vibración y comienzan la osteoblastogénesis.

La necesidad de explorar o diseñar nuevas estrategias que promuevan la formación ósea o regeneren este tejido, derivan sobre todo del aumento en la incidencia de personas con osteoporosis u osteopenia, así como de la creciente demanda de injertos o sustitutos de tejido óseo.

Particularmente, las estrategias más recientes apuntan a la regulación del destino de las células troncales mesenquimales (MSC), puesto que son las células progenitoras capaces diferenciarse osteoblastos, pero que también pueden dar origen a fibroblastos, adipocitos, condrocitos y miocitos.

Pese a la gran cantidad de ensayos que existen sobre LMHFV en modelos *in vitro*, el conocimiento que se ha obtenido es limitado y poco concluyente debido a que cada diseño experimental utiliza distintos parámetros de vibración, y diferentes sistemas o dispositivos para generar las oscilaciones.

Con relación a estos dispositivos, se han descrito herramientas como biorreactores, plataformas comerciales, agitadores y plataformas con sistemas piezoeléctricos, entre otros.

Por lo tanto, la gran diferencia en el funcionamiento de cada instrumento ha dificultado el establecimiento de parámetros puntuales de frecuencia y magnitud para dirigir la diferenciación hacia un linaje en específico, y es que se sugiere que cada una de las células que conforman a los tejidos, podría responder de forma distinta ante un estímulo mecánico, dependiendo de la magnitud de este, pero también de la estructura propia de dicha célula, por ejemplo; de la conformación de su citoesqueleto y de la función que la célula realiza dentro del tejido.

La comprensión de cómo las vibraciones mecánicas afectan el comportamiento de las MSC es de gran importancia en el campo de la medicina regenerativa, en la terapia física, y en el campo de la odontología. Principalmente porque este tipo de terapia ya está siendo aplicada como adyuvante en tratamientos ortodónticos.

La comprobación de que las vibraciones mecánicas influyen de manera positiva en la diferenciación y el crecimiento de las MSC podría tener aplicaciones en el desarrollo de terapias para acelerar la regeneración de tejidos dañados o en el tratamiento de condiciones médicas específicas.

Para superar las limitantes asociadas a la variabilidad de los dispositivos empleados y la complejidad de su manipulación, es de suma importancia centrarse en su caracterización de las vibratorias, enfocarse en que el dispositivo tenga un ensamblaje y funcionamiento simples, y que además permita obtener mediciones precisas y en tiempo real, sobre las magnitudes a las que se expone a las células. Lo anterior permitirá un mejor diseño de los ensayos mecanobiológicos, contribuyendo a una mejor comprensión de los efectos de las fuerzas mecánicas en las células MSC, lo que podría ser relevante en otras áreas de la investigación biomédica y la ingeniería de tejidos.

Capítulo 2. Metodología

2.1. Tipo de estudio

En el presente estudio se empleó una estrategia experimental, longitudinal y comparativa.

2.2. Diseño y ensamblaje del dispositivo generador de vibraciones

Los elementos necesarios para la construcción de la plataforma vibratoria se eligieron tomando como referencia los componentes de plataformas similares que fueron descritas previamente en la literatura.

Una vez identificados los elementos necesarios para la construcción de la plataforma, estos se adquirieron y ensamblaron.

Los componentes que se utilizaron para la fabricación de la plataforma se enlistan e en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Componentes de la plataforma vibratoria

Componente	Características
Generador de funciones	Marca Feeltech modelo FY-2300
Amplificador de audio	Modelo XH-M542 100 watts
Altavoz	Marca cerwin vega modelo XED650C (300 watts)
Base rígida	Elaborada en acrílico con las dimensiones 20 cm x 15 cm x 3mm
Sensor de vibración	MPU 6050, acelerómetro y giroscopio de 3 ejes, microcontrolador Arduino Nano V3 atmega 328, módulo de conexión bluetooth HC-05
Software para obtención de datos	Arduino 1.8.19 (libre)

Posteriormente, y una vez conectados todos los elementos de la plataforma, la configuración resultante fue la que se muestra en la Fig. 2.1. Brevemente, un generador de funciones Marca Feeltech modelo FY-2300, fue conectado a un amplificador de audio (XH-

M542) y este a su vez se conectó a un altavoz marca cerwin (modelo XED650C) de 300 watts. En la parte superior del altavoz se colocó una base rígida de acrílico, y sobre este se colocó un sensor para capturar la lectura de los ejes x, y, y z. EL sensor se conectó a un software para adquisición de datos.

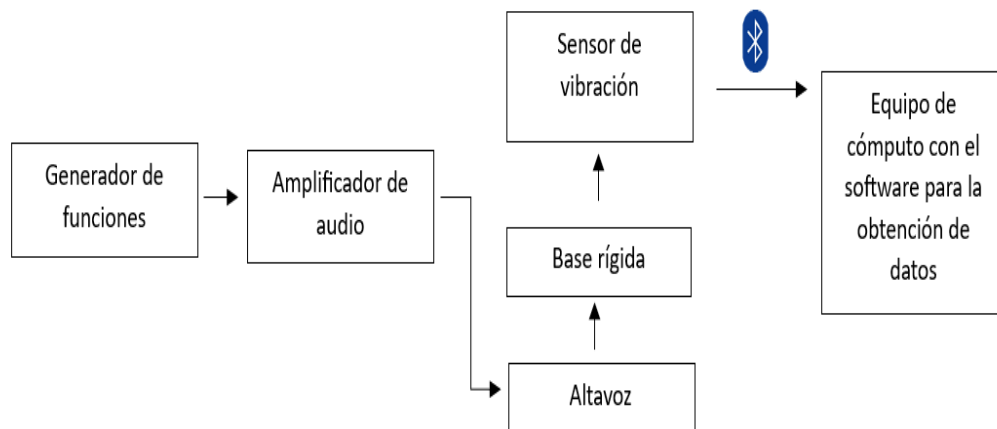


Figura 2.1. Representación de la interconexión entre los componentes de la plataforma.

2.3. Validación de los parámetros de trabajo

Los estudios *in vitro* referentes a la estimulación vibratoria concuerdan en que la estimulación vibratoria debe cumplir tener las características de ondas sinusoidales con una vibración menor 1G ($1\text{ g} = 9.8\text{ m/s}^2$, aceleración producida por la gravedad de la Tierra), y superior a 20 Hz para tener un efecto sobre la diferenciación de células mesenquimales (Melo-Fonseca et al., 2023).

Partiendo de los parámetros descritos en la literatura, para este estudio se eligió probar el efecto que producen las frecuencias de vibración de 20 y 60 Hz, aplicadas durante 20 minutos.

El primer paso en la validación de los parámetros de vibración fue evaluar la estabilidad de la señal de frecuencia (20 o 60 Hz) durante el tiempo deseado. Para lograrlo, se conectó un osciloscopio a la salida del amplificador, y se registró cada 5 minutos el valor de frecuencia arrojado por el osciloscopio.

Para verificar que los desplazamientos generados en la plataforma mantuvieran una magnitud menor de 1G (9.8m/s^2), se construyó y programó un sensor, constituido de un acelerómetro, con el cuál se obtuvieron los valores de aceleración correspondientes a los ejes de X, Y y Z. En una primera medición se registró la aceleración sin considerar el plato de cultivo, y en una segunda medición se colocó el plato de cultivo junto con el medio. Mediante el software para transmisión de datos (Arduino 1.8.19), se registraron aproximadamente 356 datos por segundo, mismos que se analizaron para descartar magnitudes de aceleración superiores a 1G.

Una segunda caracterización del funcionamiento de la plataforma fue realizada en el laboratorio de Acústica del Instituto de Ciencias Aplicadas y tecnología (ICAT-UNAM), específicamente, se realizó una comprobación de la forma de onda, frecuencia, magnitud o aceleración, y se obtuvieron los valores de desplazamiento. Para esta evaluación se fijó un acelerómetro sobre la parte superior de la plataforma y se empleó el osciloscopio modelos MD03032 (Tektronix, Inc., Oregon, USA) para visualizar y analizar la señal generada por la vibración de 20 y 60 Hz, durante 20 minutos.

2.4. Cultivo celular.

Para este proyecto se empleó una línea de células troncales mesenquimales humanas derivadas de tejido gingival (TG-MSC). Esta línea fue donada amablemente por el Dr. Juan José Montesinos, del Laboratorio de Células Troncales e Investigación en Oncología del Centro Médico Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Previamente a su donación, las células fueron caracterizadas mediante citometría de flujo y expresaron niveles altos de marcadores de superficie, como el CD105, CD90 y CD73, así mismo, expresaron niveles moderados de HLA-ABC, fueron negativas para la expresión de HLA-DR, y negativas a la expresión de marcadores hematopoyéticos como CD34, CD45 y CD14, son negativas para marcadores endoteliales como CD31. Estas células demostraron ser capaces de diferenciarse hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico, esto de acuerdo con los criterios establecidos por la sociedad Internacional de terapia celular (la Rosa-Ruiz et al., 2019).

Para su manipulación las células se mantuvieron en un banco, se criopreservaron y se utilizaron para los experimentos durante el tercer y cuarto pase. Las células una vez descongeladas se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Gibco-D6046) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y 1% de antibióticos-antimicóticos (Sigma-5955), y se colocaron en una incubadora a 37°C en una atmósfera de 5% CO_2 y 100% de humedad relativa. Los experimentos se realizaron por triplicado, con tres repeticiones cada vez.

2.5. Configuración de la inducción vibratoria y estudios biológicos.

En el presente experimento se consideró como factor externo el medio de inducción químico para promover la osteogénesis. Cabe mencionar que, aunque se considera que las MSCs se pueden diferenciar a varios linajes, para este proyecto solo se consideró únicamente la inducción osteogénica.

Los grupos propuestos para el presente proyecto se enlistan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Asignación de grupos y condiciones experimentales

<i>Grupo</i>	Condiciones experimentales
<i>1-Control Basal</i>	Sin vibración, medio de cultivo basal (DMEM)
<i>2-Vibración 20 Hz</i>	Con vibración, medio de cultivo basal (DMEM)
<i>3-Vibración 60 Hz</i>	Con vibración, medio de cultivo basal (DMEM)
<i>4-Control Osteogénico</i>	Sin vibración, medio de cultivo inductor (StemPro)
<i>5-Vibración 20 Hz osteogénico</i>	Con vibración, medio de cultivo inductor (StemPro)
<i>6-Vibración 60 Hz osteogénico</i>	Con vibración, medio de cultivo inductor (StemPro)

El medio de cultivo utilizado para la expansión y criopreservación, en ausencia de inductores químicos de diferenciación es el denominado como medio “basal” en la tabla 2.2.

El medio de cultivo inductor osteogénico fue el StemPro (A1007201, Gibco, Invitrogen, USA.), bajo en glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico-antimicótico al 1%.

Para los grupos 2, 3, 5, y 6 la estimulación vibratoria se realizó durante 20 minutos al día, 3 veces por semana. Los platos de los grupos 1 y 4, no fueron sometidos a estimulación vibratoria, pero se mantuvieron sobre la plataforma 20 minutos al día, 3 veces por semana.

Determinación de la viabilidad celular

En platos de cultivo de 12 pozos de sembraron un total de 4.0×10^5 células/pozo. Se dejaron adherirse por 24 h y posteriormente se procedió a asegurarlas sobre la plataforma vibratoria. La estimulación se realizó durante 20 minutos cada tercer día, y se realizaron mediciones a los 7, 14 y 21 días. Para colectar y sembrar las células estas desprendieron con tripsina 0.25%-0.02% EDTA (Sigma T2605).

Para evaluar el efecto de las vibraciones sobre la viabilidad celular, se empleó el ensayo de resazurina, cuyo principio es determinar la viabilidad de las células a través de la actividad de enzimas mitocondriales, específicamente ocurre una reducción de sales de tetrazolio a formazán, y el producto de esta reacción es susceptible a la detección mediante un espectrofotómetro.

Las evaluaciones de viabilidad se llevaron a cabo los días 7, 14, y 21. Brevemente, se añadieron 20 μ l por cada 100 μ l de resazurina 700 μ M a cada uno de los pozos y se mantuvieron en incubación durante 4 horas.

Posteriormente se recolectaron 100 μ l del sobrenadante de cada pozo y se transfirieron a una placa de 96 pozos, se realizó una lectura con un filtro de 570 nm y se creó un registro con los valores de absorbancia. Una vez realizada la lectura, se retiró el medio que contenía el reactivo resazurina, se lavaron las células con PBS y se añadió medio de cultivo fresco.

Diferenciación osteogénica

Sumado a los ensayos de viabilidad se evaluó la diferenciación osteogénica mediante el ensayo de acumulación de calcio a los 14 y 21 días después de la inducción (Sigma MAK022), y mediante la tinción de alizarina roja (Sigma A5533). Para descartar la posibilidad de que la acumulación de lípidos influya en la impedancia se realizó la tinción de rojo Oleoso a los 21 días de la inducción.

Tinción de alizarina roja

El colorante rojo de alizarina tiene afinidad por el calcio presente en los depósitos extracelulares, la apreciación de zonas teñidas de rojo brillante, son un indicativo de sitios de nucleación de cristales con alto contenido en calcio, por lo tanto, la positividad a esta tinción sugiere el inicio del proceso de mineralización de la matriz extracelular.

Al final de los días 7, 14, y 21, se retiró el medio de cultivo a las células y se les realizó un lavado con PBS, seguido a esto, a cada pozo se le añadió 1 ml de paraformaldehído al 4%

para fijar las células durante 24 horas. Posteriormente se retiró el fijador y se realizaron 3 lavados con agua destilada, luego se añadió 1 ml de metanol y se mantuvo durante 5 minutos. La solución de trabajo de alizarina roja al 2% se debe preparar y filtrar con anticipación, pasados los 5 minutos con metanol, este se retiró y se añadió 1ml de alizarina a cada pozo, los platos se protegieron de la luz y la tinción se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los resultados se analizaron en el microscopio óptico AmScope.

Tinción de rojo oleoso

El principio de esta técnica es la utilización de un colorante liposoluble y uno azoico para la identificar depósitos o gotitas de lípidos. El propósito de realizarla fue descartar la diferenciación de las células hacia el linaje adipogénico, sobre todo en los grupos que no recibieron inducción osteogénica.

Brevemente, en el día 21 de la diferenciación osteogénica, se retiró el medio de cultivo, seguido por un lavado con PBS, después se añadió 1 ml de paraformaldehído al 4% para fijar las células durante 24 horas. Al día siguiente, retiro el fijador y se realizaron 3 lavados con agua destilada, para continuar con la deshidratación de las células en un tren de alcoholes ascendente.

La solución de trabajo de rojo oleoso debe prepararse previamente. Una vez que se retiró el alcohol al 100%, se añadió 1ml de isopropanol al 60% y se retiró 5 minutos después, en seguida se añadió 1 ml de la solución de trabajo y se incubó durante 30 minutos.

El exceso de colorante se eliminó realizando lavados con agua destilada y los resultados de la tinción se observaron al microscopio.

Ensayo de acumulación de calcio

Para cuantificar la cantidad de alizarina roja unida a los depósitos de calcio en cada pozo, se realizó la extracción de la alizarina mediante el empleo de ácido acético. Brevemente, una vez realizada la tinción de alizarina roja, se añadió a los pozos 500 μ l de ácido acético al 10% en cada uno de los pozos y se incubó durante toda la noche.

Al día siguiente se desprendieron las células de la monocapa mediante el uso de una espátula de goma, y se transfirieron junto con el ácido acético a un tubo de 2ml, ya dentro de los tubos, las muestras se calentaron en un Termoblock a 85°C durante 15 minutos, y después de enfriarlas 5 minutos en hielo, se centrifugaron a 13,000 RPM durante 15 minutos.

Posteriormente se añadieron 125 μ l de hidróxido de amonio a cada tubo y se homogenizo la solución, a continuación, se tomaron 100 μ l de cada tubo y se colocaron en

una placa de 96 pozos. La absorbancia se determinó en un lector de placas empleando un filtro de 405 nm.

Análisis de datos

Se registraron los cambios en la amplitud, y frecuencia, y se realizaron estudios biológicos a diferentes tiempos de cultivo. Los resultados se expresaron como la media, y la desviación de tres experimentos independientes con un mínimo de tres repeticiones cada uno. Para el análisis estadístico de los resultados se empleó el software GraphPad Prism Versión 10.0.0 (131), se realizó una prueba de normalidad de Shapiro Wilk y una *t-student* para las comparaciones entre grupos, considerando una $p \leq 0.05$ como significativa.

Capítulo 3. Resultados

3.1. Caracterización y Validación de la plataforma

Los datos de la señal de frecuencia que se registraron cada 5 minutos, a lo largo de una hora, y demostraron que la frecuencia de trabajo de la plataforma fue estable tanto para el parámetro de 20 Hz, como el de 60 Hz (Anexo 1). Asimismo, se descartó algún error en la señal o fluctuaciones de esta, ya que los valores programados en el generador de funciones coincidían con los registrados por el osciloscopio.

El valor promedio de la aceleración producida de los ejes X, Y, Z se obtuvo mediante el análisis de 428,000 datos registrados por el acelerómetro, y corresponden a un tiempo de trabajo de 20 minutos. Adicionalmente se registró la temperatura del sensor.

El concentrado del análisis se muestra en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Valores promedio de aceleración para cada frecuencia

Frecuencia		Eje X	Eje Y	Eje Z	Temperatura
20 Hz sin plato de cultivo	Promedio	-2.36 cG	3.25 cG	66.18 cG	27.23 °C
	Desviación estándar	7.98	17.46	129.99	0.16
20 Hz con plato de cultivo	Promedio	-3.15 cG	2.26 cG	98.04 cG	29.47 °C
	Desviación estándar	1.28	5.82	62.75	0.095
60 Hz sin plato de cultivo	Promedio	-2.85 cG	2.85 cG	92.46 cG	28.76 °C
	Desviación estándar	35.15	10.50	90.19	0.63
60 Hz con plato de cultivo	Promedio	-3.84 cG	2.65 cG	98.04 cG	32.22°C
	Desviación estándar	10.64	8.61	27.10	0.29

**La unidad de medición para la aceleración corresponde a centigravedades (cG)*

Una vez obtenidos los promedios de aceleración, se verificó que los valores correspondientes al eje de X cumplieran con la condición descrita en la literatura, es decir, menor a 1G ($G = 9 \text{ m/s}^2$). Para ambas frecuencias en ausencia o presencia del plato de cultivo, la magnitud de aceleración fue menor a 1G, por lo tanto, se pueden considerar de baja magnitud, a las vibraciones en sentido vertical (eje de Z), generadas por la plataforma.

Respecto a la temperatura registrada al interior del sensor, el aumento se limitó únicamente a 5 °C y esto se asoció con el hecho de que el sensor se mantuvo trabajando de forma continua, es decir, sin espacio entre cada registro.

Para realizar una segunda validación de los parámetros de vibración, se realizó una caracterización en el laboratorio de acústica del ICAT, las mediciones se registraron con un osciloscopio y acelerómetro, tal como lo muestra la Fig. 3.1 A, empleando nuevamente los mismos platos de cultivo y el mismo volumen que ocuparía el medio de cultivo (Fig. 3.1 B). La Figura 3.1 C y 3.1 D, muestran los datos registrados para la frecuencia de 20 Hz, y el tipo de onda sinusoidal generada por el equipo, mientras que las figuras 3.1 E y 3.1 F muestran los valores registrados para la frecuencia de 60 Hz, con su respectiva onda sinusoidal.

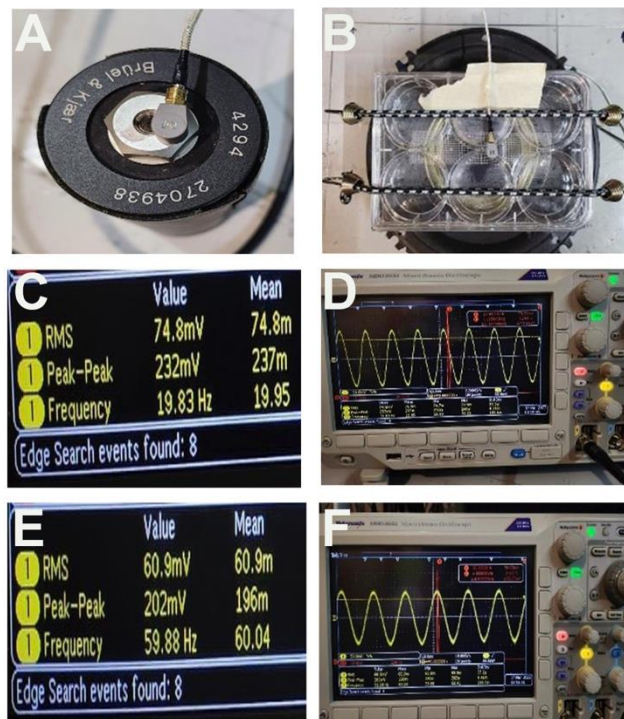


Figura 3.1. Segunda caracterización de la plataforma. A), dispositivo empleado para medir la aceleración. B), plataforma ensamblada, se incluyó una placa de 6 pozos para la evaluación. C), pantalla del osciloscopio que muestra el valor promedio registrado para la frecuencia de 20 Hz. D), onda sinusoidal formada a 20 Hz de frecuencia vibratoria. E) pantalla del osciloscopio que muestra el valor promedio registrado para la frecuencia de 60 Hz. F) onda sinusoidal formada a 60 Hz de frecuencia vibratoria.

Los resultados de la caracterización demostraron que, los desplazamientos provocados por la plataforma trazaban una onda de tipo sinusoidal estable. Respecto al componente de frecuencia, en algunos momentos se apreció una ligera variación menor a 1 Hz, los valores promedio, máximo y mínimo se incluyen en la tabla 3.4. El desplazamiento producido en cada movimiento se calculó tomando como referencia el valor de RMS y las equivalencias marcadas en el calibrador del acelerómetro.

Tabla 3.4 Registro de frecuencia y cantidad de desplazamiento

<i>Frecuencia Programada</i>	Promedio	Máximo	Mínimo	Desplazamiento
20 Hz	19.95 Hz	20.05 Hz	19.83 Hz	7.4 μm
60 Hz	60.04 Hz	60.41 Hz	58.88 Hz	6 μm

Una vez demostrada la estabilidad de la plataforma, y con los parámetros de vibraciones de baja magnitud y alta frecuencia cubiertos, se implementó este dispositivo en los ensayos *in vitro*.

3.2. Ensayos biológicos

3.2.1. Viabilidad

El efecto de las vibraciones sobre la viabilidad de las células TG-MSC se evaluó a los 7, 14 y 21 días. Los resultados del ensayo de resazurina demostraron que a los 7 días de cultivo la viabilidad de las TG-MSC en condiciones de inducción osteogénica y sometidos a 0 Hz de vibración incrementa (117.08%) comparada con el control (100%).

Por el contrario, al estimularse con 20 Hz, las TG-MSC muestran un ligero incremento en la viabilidad con el medio basal (104.4%), mientras que en condiciones de inducción la viabilidad disminuyó (87.08%).

Los mejores resultados para viabilidad se observaron en las células sometidas a 60 Hz de vibración con el medio basal, que mostraron un aumento del 23.18% de viabilidad comparada con el grupo de 0 Hz. Igualmente, las células TG-MSC estimuladas con 60 Hz en condiciones de inducción osteogénica, mostraron un incremento de 5.29% de viabilidad comparada con el grupo de 0 Hz de estimulación (Fig.3.7).

Para el día 14, la viabilidad de las células del grupo control (0 Hz) con medio de cultivo basal, continuó representando el porcentaje más alto (100.70%) en comparación con los grupos experimentales, en donde el grupo de vibración a 60 Hz presentó el valor más bajo.

Algo notable fue la disminución de la viabilidad celular en los grupos con medio osteogénico, cuyo porcentaje descendió por debajo del 50 % (Fig.3.7).

El día 21 el grupo de vibración a 20 Hz, con medio de cultivo osteogénico, presentó el mayor porcentaje de viabilidad (120.53%) y para los grupos con medio de cultivo basal, la viabilidad se restauró por encima del 50% (Fig.3.7), siendo la vibración con 60 Hz la que obtuvo el valor más alto (119.57%). Los resultados del ensayo de viabilidad se muestran en la Figura 3.

3.2.2 Inducción osteogénica y estimulación vibratoria

3.2.2.1. Tinción de alizarina roja

Las vibraciones producidas por la plataforma fueron capaces de incrementar el número de nódulos de calcio positivos para la tinción de alizarina roja, así como de incrementar la cantidad de calcio en los grupos inducidos con medio de diferenciación osteogénica.

Además, tuvieron un efecto en la morfología de las células mesenquimales a tiempos de cultivo largos de 21 días.

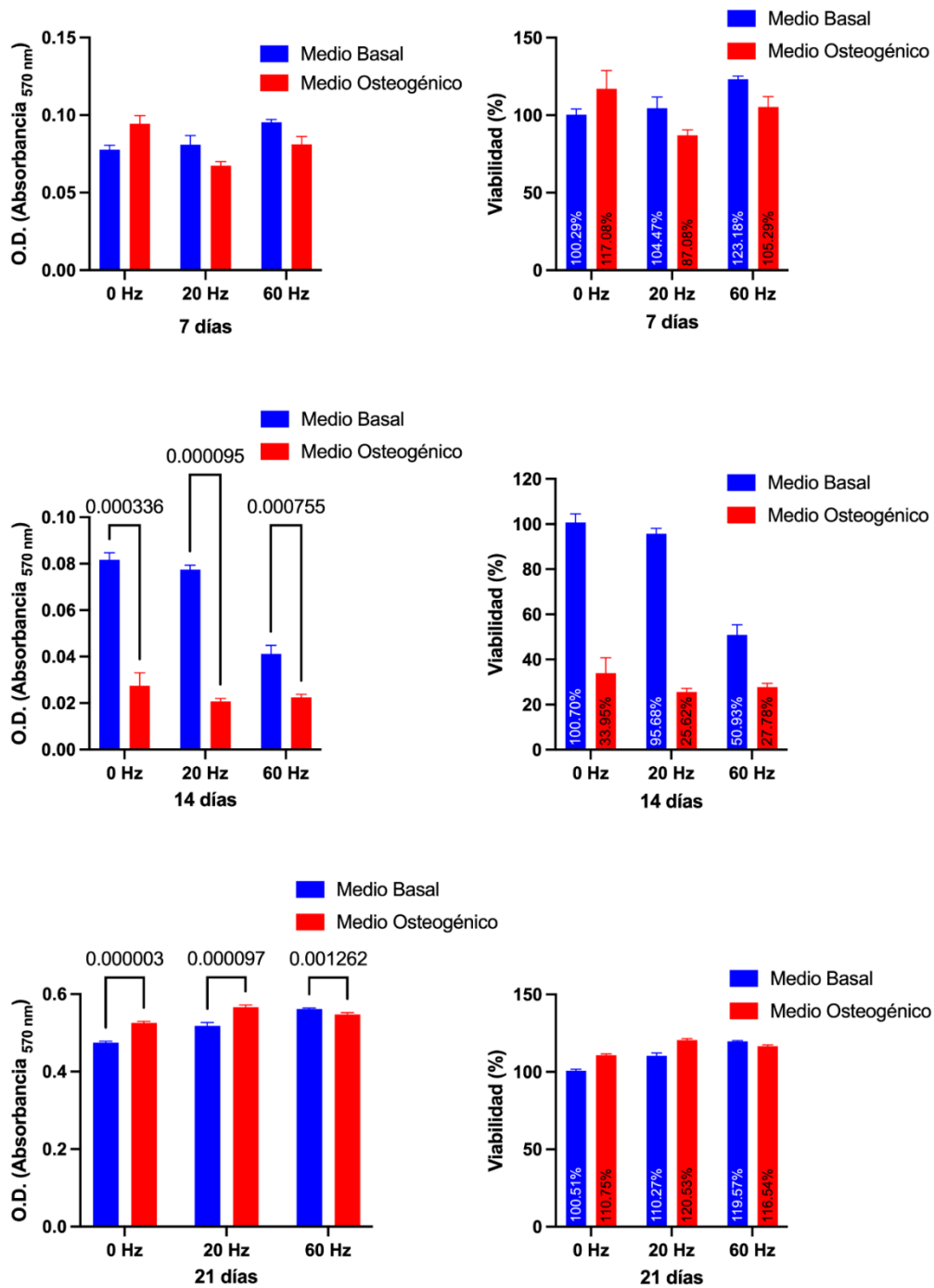


Figura 3.7. Evaluación de la viabilidad celular. Gráficas correspondientes a los valores de absorbancia y del porcentaje de células viables al realizar la evaluación los días 7 , 14 y 21. Las diferencias significativas con el valor de p se ilustran en los brackets.

La figura 3.8 corresponde a los grupos 1 (0 Hz), 2 (20 Hz) y 3 (60 Hz), al inicio del ensayo, así como a los días 7, 14 y 21. En las fotomicrografías se aprecia la monocapa de células TG- MSC después de teñirlas con alizarina roja.

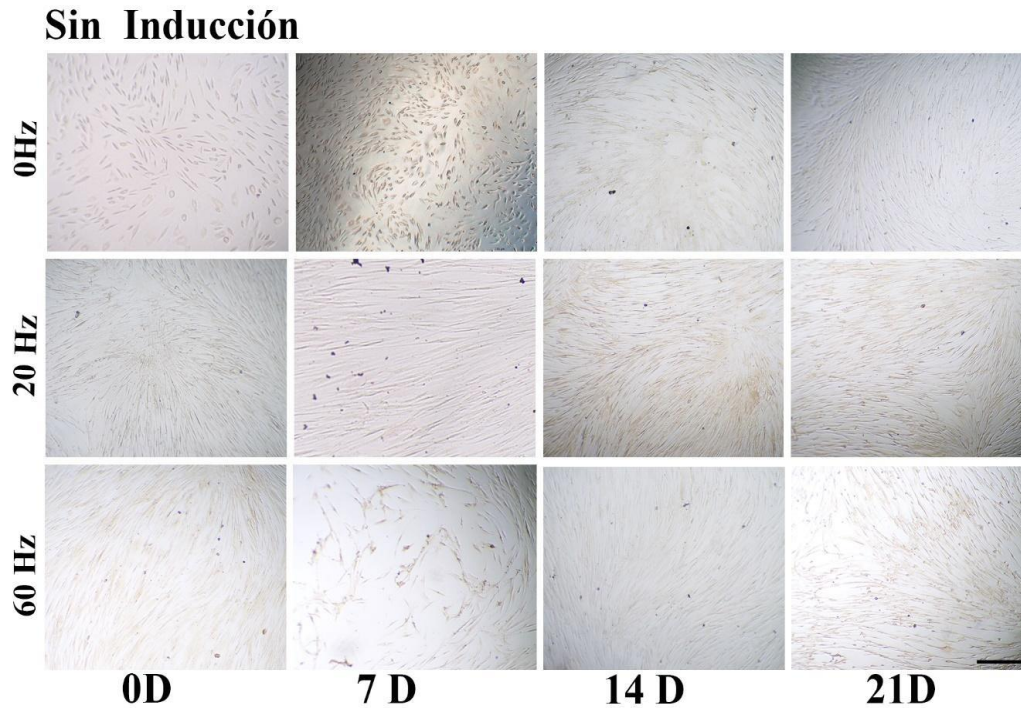


Figura 3.8. Resultados de la tinción de alizarina roja, realizada los días 0,7, 14 y 21 en los grupos sin medio inductor, Objetivo 10X, barra de escala 200 μ m

A los 7 días de cultivo, y en ausencia del medio de inducción osteogénica las células del grupo control (0 Hz) mostraron una morfología ahusada y ligeramente estrellada, con citoplasma escaso y un núcleo prominente. Por el contrario, las células de los grupos estimulados con 20 o 60 Hz, exhibieron una morfología tipo fibroblástica, con un citoplasma escaso y alargado, y un núcleo central también alargado. Es posible que la vibración influyera sobre distribución de las células en cada pozo y esto se observa en los distintos patrones que se generaron. Para el grupo de 60 Hz, en los días 7 y 14 se observó una menor densidad de células al centro del campo vibratorio, consistente con un desprendimiento de la monocapa en esta área, sin embargo, este desprendimiento se volvió a poblar con las TG- MSC al día 21.

La tinción de alizarina roja exhibió un color rosa pálido o transparente en los grupos sin medio inductor a las 7, 14 y 21 días de cultivo, por lo que se considera como negativa.

En el caso de los grupos 4 (0 Hz), 5 (20 Hz) y 6 (60 Hz) en condiciones de inducción osteogénica (Fig. 3.9), las TG-MSC mostraron una morfología fibroblástica, con un citoplasma alargado, citoplasma escaso y núcleo central a los 0 y 7 días de cultivo.

En las microfotografías que corresponden a la evaluación el día 7 se puede apreciar a las células del grupo control teñidas de un tono entre rojo y rosa pálido, con un tono más oscuro para algunos aglomerados celulares que se observaron en grupo 6 (60 Hz).

A partir del día 14 la tinción de alizarina roja mostró zonas de pequeños nódulos o aglomerados con un rojo intenso comparado con los grupos sin inducción.

Interesantemente, el grupo 4 (0 Hz) a los 14 días de inducción mostró escasos nódulos de calcio positivos para la alizarina roja. Los mejor resultados de la tinción se observaron en el grupo de 6 (60 Hz) (Fig.3.9).

Finalmente, en las microfotografías correspondientes al día 21, se muestra positividad a la tinción, con un color rojo intenso a lo largo de los pozos en condiciones de inducción.

Es necesario destacar, que la morfología fibroblástica, alargada, con un escaso citoplasma y núcleo central no es visible en ninguno de los pozos en condiciones de inducción, posiblemente porque las células han formado una matriz celular abundante y han quedado embebidas dentro de la matriz mineralizada (Fig.3.9)

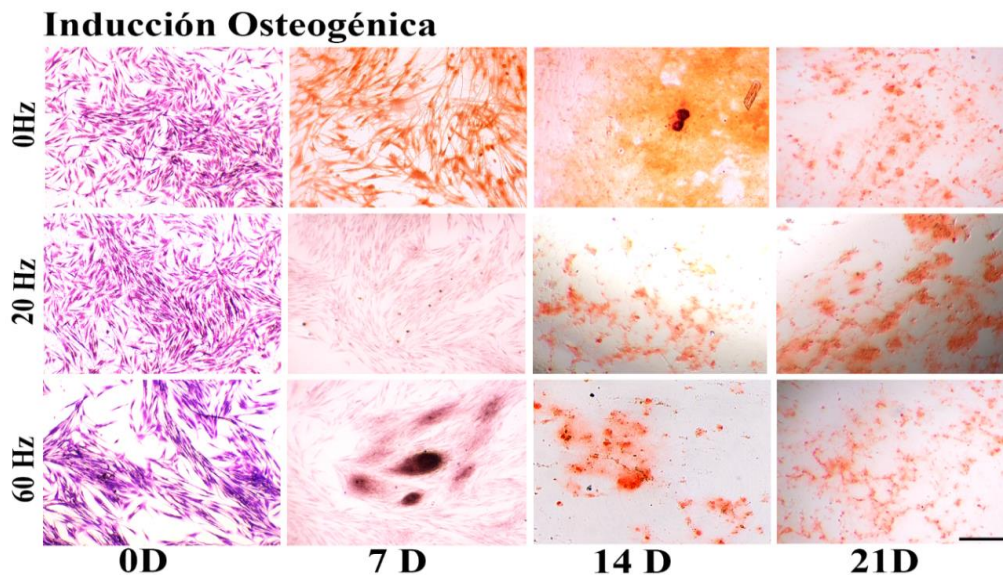


Figura 3.9. Microfotografías representativas de la tinción de alizarina roja en los grupos en condiciones de inducción osteogénica. La tinción se realizó a los 7, 14 y 21 días. La primera columna muestra microfotografías de las células TG-MSC teñidas con cristal después de 24 h de adhesión, y después de ser vibradas por primera

vez con 20 o 60 Hz, con la finalidad de apreciar la morfología celular y la distribución de la monocapa. Magnificación 10X, barra de escala 200 μm .

3.2.2.2 Ensayo de acumulación de calcio

Para cuantificar la diferenciación osteogénica se realizó un ensayo de acumulación de calcio mediante la extracción del colorante de alizarina roja. En concordancia con la tinción de alizarina roja, mostraron una densidad óptica (O.D.) promedio para los grupos estimulados con 0 Hz, 20 Hz o 60 Hz de vibración sin medio inductor fue de 0.403, 0.569 y 0.555 respectivamente, y dicho promedio de absorbancia fue menor a la encontrada en los grupos en condiciones de inducción.

En el caso de los grupos en condiciones de inducción y estimulados con 0 Hz, 20 Hz, y 60 Hz, la absorbancia a los 14 días fue de 0.423, 1.223 y 1.199 respectivamente.

Los resultados sugieren que las células TG-MSC sin estimulación vibratoria a los 14 días con medio inductor muestran escasa producción de matriz mineral. Sin embargo, al ser sometidas a estímulos vibratorios incrementas la producción de matriz mineral con resultados similares, independientemente de la frecuencia utilizada (Fig. 3.10).

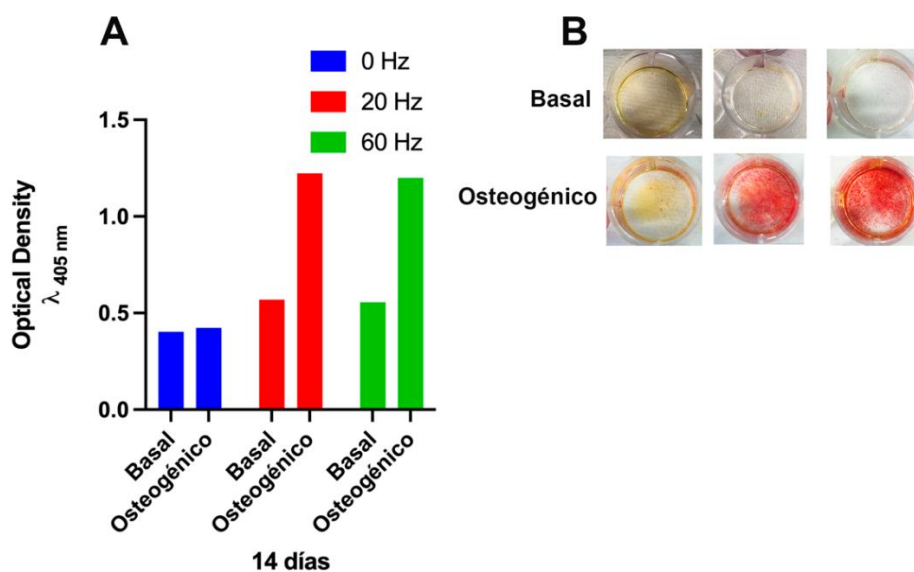


Figura 3.10. Extracción y cuantificación de alizarina roja, evaluación a los 14 días. A) Gráfica del valor promedio de absorbancia registrado para los grupos control, 20 y 60 Hz con o sin medio de inducción. B) Pozos representativos de cada condición después de realizar la tinción. Densidad óptica tomada con el filtro de 405 nm.

En el día 21, nuevamente los grupos de 0, 20, y 60 Hz con medio osteogénico mostraron valores de absorbancia de 0.986, 1.234, y 1.239 respectivamente; y esta fue menor comparada con los grupos del medio basal, siendo esta de 0.982, 1.234 y 1.239 para los grupos de 0, 20 y 60 Hz (Fig.3.11).

Cabe resaltar, que el valor de absorbancia para el grupo del medio basal incremento en los grupos estimulados con 20 y 60 Hz de vibración, y pese a que los nódulos de calcio no fueron visibles en estos pozos, los resultados sugieren que las vibraciones estimulan la secreción de Ca en las células TG-MSC.

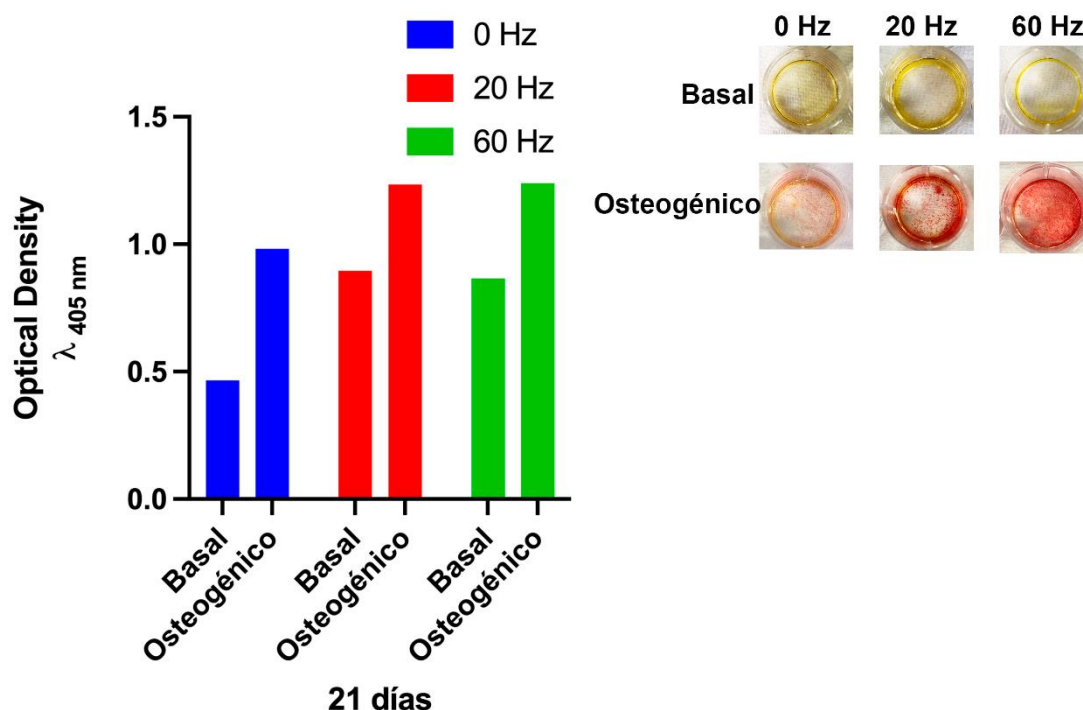


Figura 3.11. Extracción y cuantificación de alizarina roja, evaluación a los 21 días. A) Gráfica del valor promedio de absorbancia registrado para los grupos control, 20 y 60 Hz con o sin medio de inducción. B) Pozos representativos de cada condición después de realizar la tinción. Densidad óptica tomada con el filtro de 405 nm.

3.2.2.3. Tinción de rojo oleoso

La tinción de rojo oleoso se realizó el día 21 del ensayo con el objetivo de descartar la diferenciación hacia el linaje adiposo de las TG-MSC. En las micrografías de los grupos control (0 Hz) y 20 Hz con medio de cultivo basal (Fig. 3.12) se aprecian células de aspecto ahusado cuyo citoplasma se encuentra teñido de un tono rosa tenue. Por otro lado, aunque

las células del grupo de 60Hz se tiñeron igualmente de rosa tenue, éstas exhibieron una morfología menos homogénea, es decir, se observan células igualmente ahusadas, pero también se distinguen al centro del campo, células con prolongaciones citoplasmáticas más cortas y con un aspecto estrellado e incluso ovalado.

En las microfotografías que corresponden a los grupos con medio de cultivo inductor también se observó un fondo de una tonalidad rosa tenue, sin embargo, esta coloración no corresponde al interior de las células, las cuales no son distinguibles, sino que, al parecer, corresponde a un depósito de colorante en la matriz mineral. Un aspecto destacable de las imágenes de estos grupos es la presencia de manchas pequeñas de color marrón intenso que se adhirieron al fondo después añadir agua para lavar el exceso de la tinción.

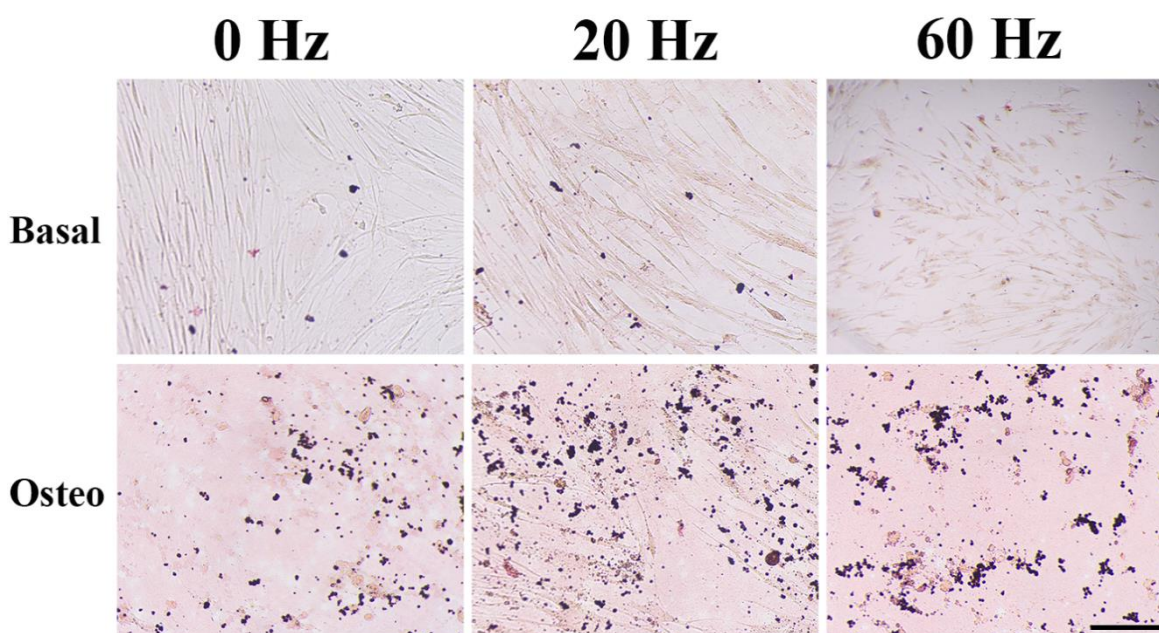


Figura 3.12. Microfotografías representativas de la tinción de rojo oleoso. Primera fila, células cultivadas con medio basal, la tinción se consideró negativa para todos los grupos. Segunda columna, células cultivadas con medio osteogénico, la tinción se consideró negativa para todos los grupos. Magnificación 10X, barra de escala 200 μm .

Capítulo 4. Discusión

4.1. La plataforma vibratoria construida, produce vibraciones de baja magnitud y alta frecuencia.

Los resultados de la investigación aquí presentada muestran que se construyó una plataforma cuyo diseño partió de modelos descritos previamente en la literatura (Lau et al., 2010; Marycz et al., 2016; Marędziak et al., 2017), en su construcción se incluyeron los elementos necesarios para hacer posible la generación de ondas sinusoidales cuya frecuencia pudiese modificarse según los intereses del operador.

La plataforma se diseñó con partes seleccionadas específicamente para ajustarse los platos de cultivo celular disponibles, y para estimular óptimamente a las células TG-MSC con frecuencias entre los 20 y 100 Hz.

El producto resultante permitió vibrar los platos de cultivo con desplazamientos mínimos, haciendo que las células TG-MSC pudieran recibir vibraciones estables a lo largo del área de cultivo con diferentes niveles de frecuencia. Además, el diseño experimental considero el impacto de la resonancia intrínseca de la bocina y de los otros componentes para la evaluación de los resultados *in vitro*.

Aún cuando el propósito de este estudio fue crear un dispositivo con un funcionamiento y ensamblaje sencillos, el diseño de esta plataforma mejoraría considerablemente al integrar métodos como el análisis de elementos finitos.

El análisis por elemento finito se basa en el principio de dividir un objeto o estructura continua en un gran número de elementos más pequeños y manejables, como triángulos o cuadriláteros en dos dimensiones, o tetraedros y hexaedros en tres dimensiones. Cada uno de estos elementos se considera como un componente individual con propiedades mecánicas y geométricas específicas.

En este sentido, y de acuerdo con lo reportado por Campsie y colaboradores en 2019 (Campsie et al., 2019) considerar los valores de todas las posibles variables que influyen en la dinámica de desplazamiento, dentro del diseño de la plataforma, permite fabricar dispositivos reproducibles con una salida vibratoria consistente.

Para validar la frecuencia y evaluar tanto la magnitud como el desplazamiento, se emplearon herramientas confiables y desarrolladas específicamente con esa función, sin embargo, se debe destacar que existen algunas otras alternativas para obtener información sobre el movimiento producido por la plataforma, y quizás una de las más precisas es la técnica de interferometría, ya que el interferómetro laser puede determinar cambios incluso a nano escala (Campsie et al., 2019).

Los parámetros de frecuencia que se probaron en este estudio se encontraban dentro del rango de 20-100 Hz, y según lo descrito en la literatura, se consideran como vibraciones de alta frecuencia (Lau et al., 2011; Steppe et al., 2020). Aunque las frecuencias de 30-45 Hz son las más empleadas en ensayos *in vitro*, para el presente estudio se seleccionaron las frecuencias de 20 y 60 Hz porque su potencial osteogénico se ha reportado en ensayos clínicos (Reyes et al., 2011).

El tiempo de estimulación vibratoria, al igual que la frecuencia, siguió las pautas marcadas en la literatura, se eligió un parámetro de 20 minutos puesto que es uno de los más reportados, y en particular es lo que recomienda el fabricante para el dispositivo utilizado en odontología, AcceleDent.

La selección de la frecuencia de las vibraciones se realizó con forme a lo recomendado por Qing y colaboradores, quienes estudiaron los efectos de la vibración en ratas ovariectomizadas (Qing et al., 2016). En dicho estudio, la vibración se realizó en intervalos de dos días, los resultados sugieren que la función de los osteoblastos no mejora significativamente con una exposición diaria a la vibración.

En varios estudios LMHFV, la osteogénesis aumenta significativamente al vibrar MSC en platos de cultivo convencional con aceleraciones de 0,3 g; y a 35 o 45 Hz de frecuencia. En exámenes que comparan rangos de vibración frecuencias y aceleraciones, las tasas de proliferación de las MSC también aumentaron a medida que la frecuencia aumentó para 0,2 y 0,3 g, pero no para otros valores de aceleraciones (Mehta et al., 2018; Sharma et al., 2021). Similar a lo que se encontró en el presente estudio, en particular para la frecuencia de 60 Hz a los 21 días de cultivo.

4.2. La estimulación vibratoria produce un efecto sobre la viabilidad de las células mesenquimales derivadas de tejido gingival (TG-MSC).

La estimulación vibratoria tiene efectos sobre los resultados de viabilidad de las células TG-MSC, evaluado con el ensayo de resazurina. A tiempos cortos, (7 días) los valores de absorbancia en los grupos vibrados disminuyen comparados con las células no vibradas. En este respecto, es posible que un menor porcentaje de células estuviese presente en los grupos experimentales en comparación con el control.

Lau y colaboradores (Lau et al., 2011) evaluaron la proliferación celular en células mesenquimales inmediatamente después de recibir la vibración (0 días) con la intención de verificar que no sea la misma vibración la que promueva el desprendimiento de las células de la placa de cultivo, durante las horas iniciales ensayo. Los resultados de Lau y colaboradores sugieren que, pese a la disminución inicial en la viabilidad, las vibraciones son capaces de incrementar la proliferación celular a largo plazo.

El diseño experimental de estos autores consistió en modelo de expansión *in vitro* para probar los efectos de la aplicación diaria del estímulo vibratorio en células mesenquimales derivadas de médula ósea que se sometieron a un total de 60 pases, sus resultados sugieren que las vibraciones tienen un papel importante en la progresión del ciclo celular durante la expansión prolongada a través del reclutamiento de la proteína CDK1 por parte del gen RanGAP1.

Por otro lado, la disminución de la viabilidad en los grupos con medio osteogénico a los 14 días podría estar vinculada al proceso de diferenciación celular, y es que una vez los receptores de las MSC reciben un ligando proveniente principalmente del medio inductor, las células detienen etapa proliferativa para dar paso a su diferenciación y con ello la adquisición de características propias de su linaje (Tjempakasari et al., 2021).

A pesar de que los resultados sugieren que las vibraciones mecánicas no tienen propiamente un efecto citotóxico sobre la viabilidad de las MSC, para futuras investigaciones sería adecuado realizar ensayos que evalúen directamente la proliferación celular, recordemos que el ensayo de resazurina nos permite inferir un número de células partiendo del total inicial, sin embargo, por ser una técnica que evalúa el metabolismo celular los datos que se obtienen podrían sugerir un aumento o una disminución en la actividad metabólica celular y no necesariamente la proliferación o apoptosis de las células (Rampersad, 2012).

4.2. La estimulación vibratoria mejora la diferenciación osteogénica de las células TG-MSC.

Si bien, la mayoría de los ensayos *in vitro* sobre LMHFV emplea medios inductores (Campsie et al., 2019; Edwards & Reilly, 2015), el presente estudio es uno de los pocos estudios en los que se analizó el efecto de la vibración sin el uso de un medio osteogénico, esto con la intención de discernir un poco más acerca de si la estimulación mecánica por sí sola es capaz de promover la diferenciación osteogénica o si tiene un efecto potenciador ante la presencia de un medio inductor.

Los resultados de la tinción de alizarina roja indicativa de depósitos de calcio y de sitios de nucleación para los cristales de hidroxiapatita, sugieren que la vibración por sí sola no es suficiente para activar el proceso de diferenciación osteogénica, la cual resultó negativa en los grupos del medio basal. Por el contrario, en los grupos donde se empleó un medio diferenciante, la producción de matriz mineralizada fue superior en los grupos vibrados comparados con los no vibrados, con los mejores resultados observados para el grupo donde se utilizaron 60 Hz de vibración; y lo anterior va en congruencia con los resultados del ensayo de absorción de calcio.

Resultados publicados anteriormente por Judex y colaboradores (Judex & Pongkitwitoon, 2018) quienes compararon dos dispositivos de vibratorios de ortodoncia, el AcceleDent y el VPro5 para estimular osteoblastos, células del ligamento periodontal, y osteoclastos *in vitro* sugieren que al día 7, la tinción de alizarina roja resultaría negativa, debido a que la expresión de genes relacionados con la síntesis y mineralización de la matriz extracelular ocurre días más tarde. Sin embargo, en este ensayo el resultado de tinción a los 7 días en el grupo control, resulta interesante, sobre todo porque es el interior de las células es que se aprecia teñido de color rojo intenso, y no la matriz extracelular.

Profundizando en los resultados del ensayo de absorción de calcio, se utilizó ácido acético para la extracción del colorante en lugar del cloruro de cetilpiridilio, esto de acuerdo a los resultados de Gregory y colaboradores (Gregory et al., 2004) en los que se demostró que esta técnica es más sensible y está indicada para muestras cuya mineralización pudiese ser débil.

Este trabajo resulta una primera utilización de la plataforma diseñada para estimular células mesenquimales óptimamente con ondas sinusoidales, y aunque se requieren más estudios concluyentes sobre el papel de las vibraciones en el proceso de diferenciación de las células mesenquimales, los resultados encontrados en el presente estudio son prometedores.

Investigaciones similares sugieren que, bajo ciertas condiciones de carga, las MSC pueden diferenciarse a fenotipos osteogénicos en ausencia de andamios o medios inductores (McClarren & Olabisi, 2018; Mehta et al., 2018), pero los mecanismos bioquímicos involucrados siguen sin ser entendidos en su totalidad. En el presente estudio, la diferenciación no se alcanzó en los grupos de medio basal, pero sería interesante evaluarlos a nivel proteico o génico.

Es importante mencionar, que la mayoría de los estudios que exploran los efectos de la vibración en células MSC utilizan células derivadas de médula ósea. Dentro de nuestro conocimiento este es el primer estudio que utiliza células derivadas de tejido gingival, cuya capacidad de diferenciación es menor (la Rosa-Ruiz et al., 2019). Se ha sugerido que las células mesenquimales diferentes a las derivadas de la médula ósea tienen preferencia por diferenciarse a determinados linajes dependiendo del tejido de donde provienen (Kichenbrand et al., 2019).

Pese a lo anterior la importancia de la mecanosensibilidad en el mantenimiento de la arquitectura ósea se ha vuelto evidente en experimentos donde se remueven los estímulos físicos del hueso, lo cual incrementa el tejido adiposo de la médula ósea, tal y como ocurre en pacientes que han pasado largos tiempo en cama, en pacientes parapléjicos o incluso en pacientes obesos (Siddique et al., 2016).

La tinción de rojo oleoso es una técnica que se emplea convencionalmente para confirmar la diferenciación de las MSC hacia tejido adiposo (Labeledz-Maslowska et al., 2020), la cual se realizó a los 21 días para confirmar la ausencia de depósitos de lípidos en las células TG-MSC. El fenotipo adipogénico se caracteriza por la acumulación intracelular de gotitas de lípidos, así como por la transcripción de genes específicos como el PPAR-g y la AP2 (Han et al., 2019). Aunque en el presente estudio no se midió la expresión génica de determinados marcadores, los resultados de la tinción de rojo oleoso sugieren que las células TG-MSC utilizadas en el presente estudio no se comprometen a una diferenciación adipogénica al ser estimuladas con vibraciones.

El objetivo principal de este estudio fue la creación de una plataforma vibratoria para estudiar el efecto de estímulos mecánicos sobre la viabilidad y la diferenciación de MSC, la caracterización de su funcionamiento permitió su implementación en los ensayos biológicos, pero para determinar los mecanismos moleculares que subyacen a los resultados obtenidos, es necesario aplicar técnicas adicionales que nos proporcionen información sobre las vías de señalización que podrían estar involucradas y consecuentemente las redes de expresión génica que se activan, en un panorama, ideal estas técnicas deberían aportarnos información cuantitativa, tal es el caso de la PCR en tiempo real.

Conclusiones y perspectivas

El presente trabajo tuvo como objetivo la creación de un dispositivo generador de vibraciones para su implementación en estudios de mecanobiología. Mediante elementos disponibles comercialmente y algunos ajustes de programación, su fabricación fue exitosa y resultó posible ponerla en marcha para realizar evaluaciones in vitro.

El efecto vibratorio con una frecuencia de 20 y 60 Hz pese a disminuir la viabilidad en las primeras semanas del experimento, al final de la estimulación, las vibraciones no mostraron un efecto citotóxico en las células TG-MSC a largo plazo. Sin embargo, los resultados deben ser interpretados con cautela, ya que para el efecto a sobre la proliferación a nivel molecular sería prudente analizar el nivel de expresión de genes asociados con la proliferación.

Igualmente, y para tener un mejor entendimiento sobre la diferenciación osteogénica en células TG-MSC, y sometidas a estímulos vibratorios, se deben aplicar técnicas de biología molecular que nos proporcionen información sobre los patrones de expresión génica y la síntesis de proteínas que suceden durante la estimulación vibratoria.

El campo de la mecanobiología, una gran parte de los avances y el conocimiento se han logrado gracias al desarrollo de estos dispositivos que recrean las condiciones mecánicas del entorno celular. Se deben enfatizar las ventajas que suponen la fabricación “a la medida” de cada dispositivo, ya que, no solo representan una alternativa menos costosa, también permiten la creación de protocolos de uso que se adecuan a los recursos y el equipo disponible en cada laboratorio, así como a los objetivos de cada grupo de trabajo.

Aunque el número de publicaciones sobre LMHFV ha incrementado a través de los años, aún quedan muchos actores moleculares por dilucidar e interacciones entre vías de señalización que deben esclarecerse, por lo tanto, estudios como el que hemos realizado, pretenden ser solo una pauta para continuar desentrañando la influencia de la señalización mecánica en la dinámica celular. Se necesitan nuevos ensayos donde se consideren otras posibles variables, y en los cuales se apliquen condiciones de cultivo que reproduzcan con mayor similitud el entorno fisiológico, por ejemplo, los cultivos en 3D.

Más aún, se podrían aplicar dispositivos y técnicas más sensibles para validar su funcionamiento, así como la aplicación de ciencias de la complejidad para realizar modelos predictivos y optimizar las condiciones experimentales.

Los dispositivos vibratorios actualmente utilizados en ortodoncia, al ser utilizados por el paciente, se encuentran en contacto cercano con las vibraciones, por lo que los resultados del presente estudio son relevantes en la clínica.

En particular confirman que un tiempo vibratorio de 20 minutos tiene efecto sobre las células mesenquimales, y que sugieren que no es necesario utilizarlo diariamente para observar un efecto a nivel celular.

Con forme a la literatura revisada hasta el momento para el presente trabajo, este el primer trabajo que explora el efecto vibratorio de MSC derivadas de tejidos dentales, en particular del tejido gingival.

Referencias bibliográficas

- Bakdach, W. M. M., & Hadad, R. (2020). Effectiveness of supplemental vibrational force in reducing pain associated with orthodontic treatment: a systematic review. *Quintessence Int*, 51(9), 742-752. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a44497>
- Baskan, O., Mese, G., & Ozcivici, E. (2017). Low-intensity vibrations normalize adipogenesis-induced morphological and molecular changes of adult mesenchymal stem cells. *Proc Inst Mech Eng H*, 231(2), 160-168. <https://doi.org/10.1177/0954411916687338>
- Campsie, P., Childs, P. G., Robertson, S. N., Cameron, K., Hough, J., Salmeron-Sanchez, M., . . . Reid, S. (2019). Design, construction and characterisation of a novel nanovibrational bioreactor and cultureware for osteogenesis. *Sci Rep*, 9(1), 12944. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49422-4>
- Chow, S. K. H., Ho, C. Y., Wong, H. W., Chim, Y. N., Wong, R. M. Y., & Cheung, W. H. (2020). Efficacy of low-magnitude high-frequency vibration (LMHFV) on musculoskeletal health of participants on wheelchair: a study protocol for a single-blinded randomised controlled study. *BMJ Open*, 10(12), e038578. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-038578>
- Chung, S. L., Leung, K. S., & Cheung, W. H. (2014). Low-magnitude high-frequency vibration enhances gene expression related to callus formation, mineralization and remodeling during osteoporotic fracture healing in rats. *J Orthop Res*, 32(12), 1572-1579. <https://doi.org/10.1002/jor.22715>
- Ciombor, D. M., & Aaron, R. K. (2005). The role of electrical stimulation in bone repair. *Foot Ankle Clin*, 10(4), 579-593, vii. <https://doi.org/10.1016/j.fcl.2005.06.006>
- Dhowre, H. S., Rajput, S., Russell, N. A., & Zelzer, M. (2015). Responsive cell-material interfaces. *Nanomedicine (Lond)*, 10(5), 849-871. <https://doi.org/10.2217/nnm.14.222>
- Edwards, J. H., & Reilly, G. C. (2015). Vibration stimuli and the differentiation of musculoskeletal progenitor cells: Review of results in vitro and in vivo. *World J Stem Cells*, 7(3), 568-582. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.568>
- English, K., & Mahon, B. P. (2011). Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation. *J Cell Biochem*, 112(8), 1963-1968. <https://doi.org/10.1002/jcb.23119>
- Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., . . . Lian, Q. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*, 7, e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>
- Gao, H., Zhai, M., Wang, P., Zhang, X., Cai, J., Chen, X., . . . Jing, D. (2017). Low-level mechanical vibration enhances osteoblastogenesis via a canonical Wnt signaling-associated mechanism. *Mol Med Rep*, 16(1), 317-324. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6608>

- Gilsanz, V., Wren, T. A., Sanchez, M., Dorey, F., Judex, S., & Rubin, C. (2006). Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD. *J Bone Miner Res*, 21(9), 1464-1474. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060612>
- Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., & Prockop, D. J. (2004). An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*, 329(1), 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.02.002>
- Haffner-Luntzer, M., Liedert, A., & Ignatius, A. (2016). Mechanobiology of bone remodeling and fracture healing in the aged organism. *Innov Surg Sci*, 1(2), 57-63. <https://doi.org/10.1515/iss-2016-0021>
- Han, L., Wang, B., Wang, R., Gong, S., Chen, G., & Xu, W. (2019). The shift in the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis of mesenchymal stem cells mediated by glucocorticoid receptor. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 377. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1498-0>
- Jaalouk, D. E., & Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1), 63-73. <https://doi.org/10.1038/nrm2597>
- Judex, S., & Pongkitwitoon, S. (2018). Differential Efficacy of 2 Vibrating Orthodontic Devices to Alter the Cellular Response in Osteoblasts, Fibroblasts, and Osteoclasts. *Dose Response*, 16(3), 1559325818792112. <https://doi.org/10.1177/1559325818792112>
- Katchooi, M., Cohanin, B., Tai, S., Bayirli, B., Spiekerman, C., & Huang, G. (2018). Effect of supplemental vibration on orthodontic treatment with aligners: A randomized trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 153(3), 336-346. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2017.10.017>
- Kichenbrand, C., Velot, E., Menu, P., & Moby, V. (2019). Dental Pulp Stem Cell-Derived Conditioned Medium: An Attractive Alternative for Regenerative Therapy. *Tissue Eng Part B Rev*, 25(1), 78-88. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2018.0168>
- Kim, Y. S., Kim, S. J., Yoon, H. J., Lee, P. J., Moon, W., & Park, Y. G. (2013). Effect of piezopuncture on tooth movement and bone remodeling in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 144(1), 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2013.01.022>
- la Rosa-Ruiz, D., del Pilar, M., Álvarez-Pérez, M. A., Cortés-Morales, V. A., Monroy-García, A., Mayani, H., . . . Candanedo-González, F. (2019). Mesenchymal stem/stromal cells derived from dental tissues: a comparative in vitro evaluation of their immunoregulatory properties against T cells. *Cells*, 8(12), 1491.
- Labeledz-Maslowska, A., Bryniarska, N., Kubiak, A., Kaczmarzyk, T., Sekula-Stryjewska, M., Noga, S., . . . Zuba-Surma, E. (2020). Multilineage Differentiation Potential of Human Dental Pulp Stem Cells-Impact of 3D and Hypoxic Environment on Osteogenesis In Vitro. *Int J Mol Sci*, 21(17). <https://doi.org/10.3390/ijms21176172>

- Lau, E., Al-Dujaili, S., Guenther, A., Liu, D., Wang, L., & You, L. (2010). Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. *Bone*, *46*(6), 1508-1515. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.02.031>
- Lau, E., Lee, W. D., Li, J., Xiao, A., Davies, J. E., Wu, Q., . . . You, L. (2011). Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteogenic differentiation of rat mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res*, *29*(7), 1075-1080. <https://doi.org/10.1002/jor.21334>
- Lim, C. T., Bershadsky, A., & Sheetz, M. P. (2010). Mechanobiology. *J R Soc Interface*, *7 Suppl 3*(Suppl 3), S291-293. <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0150.focus>
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G. (2018). Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol*, *9*, 824. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>
- Marycz, K., Lewandowski, D., Tomaszewski, K. A., Henry, B. M., Golec, E. B., & Marędzia, M. (2016). Low-frequency, low-magnitude vibrations (LFLM) enhances chondrogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). *PeerJ*, *4*, e1637. <https://doi.org/10.7717/peerj.1637>
- Marędzia, M., Lewandowski, D., Tomaszewski, K. A., Kubiak, K., & Marycz, K. (2017). The Effect of Low-Magnitude Low-Frequency Vibrations (LMLF) on Osteogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Mol Bioeng*, *10*(6), 549-562. <https://doi.org/10.1007/s12195-017-0501-z>
- Maurer, M., & Lammerding, J. (2019). The Driving Force: Nuclear Mechanotransduction in Cellular Function, Fate, and Disease. *Annu Rev Biomed Eng*, *21*, 443-468. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-060418-052139>
- McClarren, B., & Olabisi, R. (2018). Strain and Vibration in Mesenchymal Stem Cells. *Int J Biomater*, *2018*, 8686794. <https://doi.org/10.1155/2018/8686794>
- Mehta, S., McClarren, B., Aijaz, A., Chalaby, R., Cook-Chennault, K., & Olabisi, R. M. (2018). The effect of low-magnitude, high-frequency vibration on poly(ethylene glycol)-microencapsulated mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng*, *9*, 2041731418800101. <https://doi.org/10.1177/2041731418800101>
- Melo-Fonseca, F., Carvalho, O., Gasik, M., Miranda, G., & Silva, F. S. (2023). Mechanical stimulation devices for mechanobiology studies: a market, literature, and patents review. *Bio-Design and Manufacturing*, *6*(3), 340-371. <https://doi.org/10.1007/s42242-023-00232-8>
- Mobini, S., Leppik, L., Thottakkattumana Parameswaran, V., & Barker, J. H. (2017). effect of direct current electrical stimulation on rat mesenchymal stem cells. *PeerJ*, *5*, e2821. <https://doi.org/10.7717/peerj.2821>

- Nikukar, H., Reid, S., Tsimbouri, P. M., Riehle, M. O., Curtis, A. S., & Dalby, M. J. (2013). Osteogenesis of mesenchymal stem cells by nanoscale mechanotransduction. *ACS Nano*, 7(3), 2758-2767. <https://doi.org/10.1021/nn400202j>
- Qing, F., Xie, P., Liem, Y. S., Chen, Y., Chen, X., Zhu, X., . . . Zhang, X. (2016). Administration duration influences the effects of low-magnitude, high-frequency vibration on ovariectomized rat bone. *J Orthop Res*, 34(7), 1147-1157. <https://doi.org/10.1002/jor.23128>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*, 12(9), 12347-12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Reiss, S., Chouinard, M. C., Frias Landa, D., Nanda, R., Chandhoke, T., Sobue, T., . . . Uribe, F. (2020). Biomarkers of orthodontic tooth movement with fixed appliances and vibration appliance therapy: a pilot study. *Eur J Orthod*, 42(4), 378-386. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjaa026>
- Reyes, M. L., Hernández, M., Holmgren, L. J., Sanhueza, E., & Escobar, R. G. (2011). High-frequency, low-intensity vibrations increase bone mass and muscle strength in upper limbs, improving autonomy in disabled children. *J Bone Miner Res*, 26(8), 1759-1766. <https://doi.org/10.1002/jbmr.402>
- Rubin, C., Judex, S., & Qin, Y. X. (2006). Low-level mechanical signals and their potential as a non-pharmacological intervention for osteoporosis. *Age Ageing*, 35 Suppl 2, ii32-ii36. <https://doi.org/10.1093/ageing/afl082>
- Santin-Medeiros, F., & Garatachea Vallejo, N. (2010). [Musculoskeletal effects of vibration training in the elderly]. *Rev Esp Geriatr Gerontol*, 45(5), 281-284. <https://doi.org/10.1016/j.regg.2010.04.001>
- Sharma, V., Dash, S. K., Govarthan, K., Gahtori, R., Negi, N., Barani, M., . . . Ojha, S. (2021). Recent Advances in Cardiac Tissue Engineering for the Management of Myocardium Infarction. *Cells*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102538>
- Shi, H. F., Cheung, W. H., Qin, L., Leung, A. H., & Leung, K. S. (2010). Low-magnitude high-frequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone. *Bone*, 46(5), 1299-1305. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.11.028>
- Siddique, N., Raza, H., Ahmed, S., Khurshid, Z., & Zafar, M. S. (2016). Gene Therapy: A Paradigm Shift in Dentistry. *Genes (Basel)*, 7(11). <https://doi.org/10.3390/genes7110098>
- Simmons, C. A., Matlis, S., Thornton, A. J., Chen, S., Wang, C.-Y., & Mooney, D. J. (2003). Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *Journal*

- of Biomechanics*, 36(8), 1087-1096. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00110-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00110-6)
- Slatkowska, L., Alibhai, S. M., Beyene, J., & Cheung, A. M. (2010). Effect of whole-body vibration on BMD: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int*, 21(12), 1969-1980. <https://doi.org/10.1007/s00198-010-1228-z>
- Song, G. E., Kim, K., Lee, D. J., & Joo, N. S. (2011). Whole body vibration effects on body composition in the postmenopausal Korean obese women: pilot study. *Korean J Fam Med*, 32(7), 399-405. <https://doi.org/10.4082/kjfm.2011.32.7.399>
- Steppe, L., Krüger, B. T., Tschaffon, M. E. A., Fischer, V., Tuckermann, J., Ignatius, A., & Haffner-Luntzer, M. (2021). Estrogen Receptor α Signaling in Osteoblasts is Required for Mechanotransduction in Bone Fracture Healing. *Front Bioeng Biotechnol*, 9, 782355. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.782355>
- Steppe, L., Liedert, A., Ignatius, A., & Haffner-Luntzer, M. (2020). Influence of Low-Magnitude High-Frequency Vibration on Bone Cells and Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 595139. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.595139>
- Stewart, S., Darwood, A., Masouros, S., Higgins, C., & Ramasamy, A. (2020). Mechanotransduction in osteogenesis. *Bone Joint Res*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.91.BJR-2019-0043.R2>
- Styner, M., Thompson, W. R., Galior, K., Uzer, G., Wu, X., Kadari, S., . . . Rubin, J. (2014). Bone marrow fat accumulation accelerated by high fat diet is suppressed by exercise. *Bone*, 64, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.044>
- Szczesny, S. E., & Mauck, R. L. (2017). The Nuclear Option: Evidence Implicating the Cell Nucleus in Mechanotransduction. *J Biomech Eng*, 139(2), 0210061-02100616. <https://doi.org/10.1115/1.4035350>
- Tirkkonen, L., Halonen, H., Hyttinen, J., Kuokkanen, H., Sievänen, H., Koivisto, A. M., . . . Haimi, S. (2011). The effects of vibration loading on adipose stem cell number, viability and differentiation towards bone-forming cells. *J R Soc Interface*, 8(65), 1736-1747. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0211>
- Tjempakasari, A., Suroto, H., & Santoso, D. (2021). Mesenchymal Stem Cell Senescence and Osteogenesis. *Medicina (Kaunas)*, 58(1). <https://doi.org/10.3390/medicina58010061>
- Uzer, G., Pongkitwitoon, S., Ete Chan, M., & Judex, S. (2013). Vibration induced osteogenic commitment of mesenchymal stem cells is enhanced by cytoskeletal remodeling but not fluid shear. *J Biomech*, 46(13), 2296-2302. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.06.008>
- Woloszyk, A., Buschmann, J., Waschkies, C., Stadlinger, B., & Mitsiadis, T. A. (2016). Human Dental Pulp Stem Cells and Gingival Fibroblasts Seeded into Silk Fibroin Scaffolds

- Have the Same Ability in Attracting Vessels. *Front Physiol*, 7, 140. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00140>
- Ye, S., Wei, B., & Zeng, L. (2022). Advances on Hydrogels for Oral Science Research. *Gels*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/gels8050302>
- Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: an overview. *J Glaucoma*, 23(8 Suppl 1), S20-23. <https://doi.org/10.1097/IJG.000000000000108>

Anexos

I. Glosario

Absorbancia: Medida de la radiación que absorbe una sustancia o muestra cuando sobre ésta inciden ondas electromagnéticas, cuando su medición se realiza a una longitud de onda específica se conoce como colorimetría, y si se usan todas las longitudes de onda del espectro visible, incluyendo el ultravioleta, se le conoce como espectrofotometría.

Aceleración: Magnitud vectorial que la tasa de cambio de la velocidad en con respecto al tiempo.

Acelerómetro: Instrumento empleado para medir la aceleración lineal o angular de un cuerpo.

Amplitud de onda: Distancia que existe entre el punto más alejado de una onda y su punto medio o de equilibrio.

Diferenciación celular: Proceso mediante el cual una célula se transforma a un tipo celular específico, adquiriendo estructuras y funciones particulares.

Hercio: Unidad de frecuencia en el sistema internacional de unidades, su símbolo es Hz y corresponde al número de ciclos por segundo que una onda realiza.

Gravedad: Fuerza que ejerce la Tierra sobre todos los cuerpos y que los atrae hacia su centro.

Matriz extracelular: Red tridimensional de proteínas y moléculas que proporcionan soporte estructural a las células de un organismo.

Mecanotransducción: Proceso a través del cual las células transforman señales mecánicas externas en un mensajero bioquímico para realizar una serie de modificaciones u adaptaciones en su conformación o comportamiento.

Mineralización ósea: Proceso en el cual se depositan minerales, principalmente calcio y fosfatos sobre una red de colágeno sintetizada por las células óseas.

Onda sinusoidal: Representación gráfica de una curva que describe la función trigonométrica de seno. En el movimiento armónico simple se emplea para representar el movimiento periódico de un cuerpo que oscila de un extremo a otro con respecto a su punto de equilibrio.

Osciloscopio: Dispositivo empleado para la visualización de señales eléctricas variables en el tiempo.

Osteogénesis: Proceso de formación de tejido óseo.

Viabilidad Celular: Cualidad de competencia, el concepto alude a la cantidad de células vivas, “competentes” o metabólicamente activas, con respecto al número total de células confinadas en un espacio.

Vibración: Movimiento oscilatorio de un cuerpo resultado del desplazamiento de sus partículas de extremo a otro con respecto a un punto de referencia.

II. Ensayos y técnicas

Viabilidad celular

- A) Añadir a cada pozo 10 μl de resazurina al 1x por cada 100 μl de medio de cultivo, para obtener una concentración de 700 μM .
- B) Incubar durante 4 horas.
- C) Transferir 100 μl de cada pozo a una placa de 96 pocillos
- D) Leer la absorbancia a 570 nm
- E) Retirar el medio de cultivo con resazurina, lavar con PBS y añadir medio nuevo

Tinción de Alizarina Roja

- A) Retirar el medio de cultivo y añadir 1 ml de paraformaldehído al 10% para fijar las células (durante 24 hrs)
- B) Retirar el paraformaldehído y realizar 3 lavados con agua destilada (5 minutos cada uno)
- C) Retirar el agua destilada y añadir 1 ml de metanol (5 minutos)
- D) Preparar la solución de trabajo de alizarina roja: disolver 2g de alizarina roja en 100 ml de agua bidestilada ddH₂O y ajustar el pH entre 4.1-4.3 con HCl o

NH₄OH. Filtrar la solución a través de una membrana de 0.22µm, almacenar a 4°C en un contenedor que impida el paso de la luz

- E) Retirar el metanol y añadir 1 ml de la solución de alizarina roja, proteger de la luz e incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos
- F) Retirar la solución de alizarina y realizar 2~4 lavados con agua destilada
- G) Añadir 1ml de agua bidestilada, observar la tinción al microscopio

Tinción de rojo oleoso

A) Preparar una solución de stock disolviendo .35 g de rojo oleoso en 100 ml de isopropanol, agitar toda la noche y filtrar con una membrana de 0.2 µm

B) Preparar una solución de trabajo mezclando 6ml de la solución de stock con 4 ml de ddH₂O, filtrar nuevamente

C) Remover de los pozos el fijador y lavar con PBS

D) Añadir 1ml de isopropanol al 60%, mantener durante 5 minutos

E) Retirar el isopropanol y dejar secar a temperatura ambiente durante 8 minutos

F) Añadir 1 ml de la solución de trabajo e incubar durante 30 minutos

G) Remover la solución de trabajo y lavar para retirar el exceso de tinción

Cuantificación de alizarina roja

- A) Lavar los pozos con agua desionizada para eliminar el exceso de la tinción (3 veces)
- B) Añadir a cada pozo 500 µl de ácido acético al 20%, incubar durante 24 horas
- C) Con la ayuda de un “raspador” desprender la monocapa de cada pozo, transferir el contenido a un tubo de 2ml
- D) Calentar los tubos en el termoblock a 85°C durante 10 minutos
- E) Colocar los tubos en hielo durante 5 minutos
- F) Centrifugar los tubos a 10,000 RPM durante 15 minutos
- G) Añadir 125 µl de hidróxido de amonio a cada tubo y resuspender
- H) Transferir 100 µl de la solución de cada tubo a una placa de 96 pocillos
- I) Leer la absorbancia a 405 nm

III. Tablas

I y II) Valores de frecuencia registrados por el osciloscopio, durante una hora de medición.

Hora	Frecuencia registrada en osciloscopio	Hora	Frecuencia registrada en osciloscopio
12:00	20 Hz	12:00	20 Hz
12:05	20 Hz	12:05	20 Hz
12:10	20 Hz	12:10	20 Hz
12:15	20 Hz	12:15	20 Hz
12:20	20 Hz	12:20	20 Hz
12:25	20 Hz	12:25	20 Hz
12:30	20 Hz	12:30	20 Hz
12:35	20 Hz	12:35	20 Hz
12:40	20 Hz	12:40	20 Hz
12:45	20 Hz	12:45	20 Hz
12:50	20 Hz	12:50	20 Hz
12:55	20 Hz	12:55	20 Hz
13:00	20 Hz	13:00	20 Hz