



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES  
UNIDAD LEÓN**

**TEMA:  
EFECTOS DEL ULTRASONIDO TERAPÉUTICO EN  
PROLIFERACIÓN, DESINFLAMACIÓN Y  
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES DE  
PULPA DENTAL HUMANA**

**FORMA DE TITULACIÓN:  
TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN FISIOTERAPIA**

**P R E S E N T A :  
SANDRA DENISSE SORDO CARRILLO.**

**TUTOR:  
DR. RENÉ GARCÍA CONTRERAS.**

**ASESOR:  
MTRA. CRISTINA CARRILLO PRADO.**



**LEÓN, GUANAJUATO**

**2019.**



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.

### **Agradecimientos**

- A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas a esta grán institución y brindarme la portunidad de aprender y desarrollarme durante mi bachillerato y licenciatura.
- Al Laboratorio de Investigación Interdisciplinaria de la ENES León, por permitirme realizar este proyecto en sus instalaciones.
- A la Clínica de Fisioterapia, por todo lo aprendido en estos ultimos años y motivarme a buscar nuevas alternativas de tratameinto para los pacientes.
- A mi tutor, el Dr. René García, por su paciencia, su vocación y su tiempo dedicado a esta investigación.
- A mi asesora, la Mtra. Cristina Carrillo, por su apoyo y compromiso en la realización del proyecto.
- Al Dr. Germán Villanueva, por el aporte de sus conocimientos en el área para realizar este proyecto.
- A mis profesores de licenciatura, por haberme transmitido sus conocimientos clínicos y teóricos.
- Al programa UNAM-DGAPA: PAPIME PE201617, PE208518 y IA205518. Red de farmoquímicos, por el apoyo para la realización de este proyecto.

**Dedicatoria**

*A mi padre  
Gerardo Sordo por  
siempre  
impulsarme a ser  
una mejor  
persona,  
superarme y dar lo  
mejor de mi día a  
día.*

*A mi madre Norma  
Carrillo por su  
enorme paciencia,  
apoyo y consejos  
durante toda mi  
vida.*

*A mi hermana  
Norma Sordo, mi  
compañera de  
vida.*

*A mi perrita Gaena  
por acompañarme  
durante todos  
estos años en  
desveladas, días  
buenos y malos.*

*A Raúl, Bety y Paz  
que siempre  
estuvieron para  
escucharme,  
aconsejarme y que  
al paso de los  
años nunca han  
dejado de  
apoyarme.*

*A mi tutor René  
García por todo lo  
aprendido en este  
proceso de  
titulación.*



<b>Contenido</b>	<b>Pág</b>
Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
2. Marco Teórico	11
2.1 Ultrasonido Terapéutico (UT)	11
2.2 Cultivo celular	19
2.3 Ensayos de viabilidad celular	23
2.4 Inflamación	29
3. Antecedentes	33
3.1 Antecedentes históricos del ultrasonido	33
3.2 Antecedentes de los cultivos celulares	34
3.3 Antecedentes de células troncales para la regeneración de tejidos	36
3.4 Antecedentes de células troncales de la pulpa dental humana (hDPSC)	36
4. Planteamiento del Problema	38
5. Justificación	39
6. Hipótesis	41
6.1 Hipótesis de investigación	41
6.2 Hipótesis nula	41
7. Objetivo	42
7.1 Objetivos específicos	42
8. Marco Metodológico	43
9. Variables	45
9.1 Variables dependientes	45
9.2 Variables independientes	46

10	Materiales y Métodos	48
10.1	Implicaciones éticas	48
10.2	Materiales	49
10.3	Instrumental	51
10.4	Insumos	51
10.5	Obtención, aislamiento, establecimiento, proliferación y caracterización de hDPSC	51
10.6	Ensayo de viabilidad celular y tratamiento con UT	54
10.7	Efecto desinflamatorio de UT en cultivo de hDPSC	57
10.8	Diferenciación miogénica (co-cultivo)	58
10.9	Análisis estadístico	58
11	Resultados	60
11.1	Obtención, aislamiento, establecimiento, proliferación y caracterización de hDPSC	60
11.2	Ensayo de viabilidad celular y tratamiento con UT	61
11.3	Efecto desinflamatorio de UT en cultivo de hDPSC	63
11.4	Diferenciación miogénica	63
12	Discusión	67
12.1	Obtención, aislamiento, establecimiento, proliferación y caracterización de hDPSC	67
12.2	Ensayo de viabilidad y tratamiento con UT	67
12.3	Efecto desinflamatorio de UT en cultivo de hDPSC	68
12.4	Diferenciación miogénica	68
13	Conclusión	70
14	Limitates del estudio	71
15	Relevancia clínica	71
16	Bibliografía	72
17	Productividad del Proyecto	83

## Resumen

**Introducción:** El ultrasonido-terapéutico (UT) se ha utilizado durante los últimos 50 años, los efectos positivos del UT en el tratamiento de tejidos blandos han sido descritos en estudios clínicos y no clínicos, sin embargo, su potencial uso terapéutico aún está lejos de ser establecido. A pesar de su uso a gran escala, existen pocos estudios sobre los efectos biológicos de su utilización con células troncales de pulpa dental humana (hDPSC) en proliferación y durante la diferenciación miogénica. Este estudio cultivó, aisló y caracterizó hDPSC bajo lineamientos internacionales, aplicó UT en diferentes parámetros para evaluar sus efectos en la proliferación, el efecto desinflamatorio y su potencial efecto benéfico en la diferenciación miogénica (C2C12). La proliferación celular fue determinada por el ensayo de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT). hDPSC fueron inducidas a un estado pro-inflamatorio, tratadas con UT y la expresión de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) fue cuantificada mediante ensayo de ELISA. Las hDPSC fueron co-cultivadas con C2C12 en un medio de diferenciación específico y fueron expuestas a UT, estas se evaluaron por sus características morfológicas con microscopía de fluorescencia y se realizó un ensayo de inmunocitoquímica. Los datos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk, pruebas de ANOVA post hoc de Tukey y T-student.

**Resultados:** Las hDPSC mostraron morfología fibroblastoide, adherencia a la caja de cultivo, diferenciación a linaje condrogénico, adipogénico y osteogénico. El uso del UT incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) la proliferación celular con parámetros de 1MHz en modo pulsado, 1.0 W/cm<sup>2</sup> durante 10 minutos de aplicación, también redujo la expresión de PGE<sub>2</sub> y mejoró la diferenciación miogénica en el co-cultivo mostrando características morfológicas y resultados positivos en la inmunocitoquímica además de representar una potencial fuente de células madre.

**Palabras Clave:** Terapia Ultrasónica, Terapia Extracorporal con Ondas de Choque, Ultrasonido Pulsado de Baja Intensidad (UPBI), Células Madre Adultas, Células de Pulpa Dental, Diferenciación Celular.

## Abstract

**Background:** Therapeutic Ultrasound (TU) has been used through the last 50 years, TU positive effects on soft tissues have been described in clinical and non-clinical studies, however its whole therapeutic potential is far from been established. Despite the large scale use of TU, there are few scientific studies on its biological effects in human dental pulp stem cells (hDPSC) on proliferation and during skeletal muscle differentiation, this study cultured, isolated and seeded hDPSC under international guidelines and TU was applied in different modes to evaluate the effects on proliferation, its anti-inflammatory effect and its potential benefits on skeletal muscle differentiation (C2C12). Cell proliferation was determined by MTT method. hDPSC were induced on a pro-inflammatory state and TU was applied and the expression of PGE<sub>2</sub> was quantified by ELISA assay. A co-culture of hDPSC and C2C12 were cultured in specific differentiation media and exposed to TU, and those were evaluated based on their morphological characteristics with fluorescence microscopy and Immunocytochemistry assay was performed. Data were analyzed by Shapiro-Wilk normality test and ANOVA post hoc de Tukey test.

**Results:** hDPSC showed fibroblast morphology, attachment to the plate, differentiation to adipogenic and osteogenic lineage. TU treatment showed a significant increase in cell proliferation ( $p < 0.05$ ) with 1MHz, pulsed mode, 1.0 W/cm<sup>2</sup> during 10 minutes of application, it reduced the expression of PGE<sub>2</sub> and enhanced muscle differentiation in the co-culture showing morphological characteristic and positive immunocytochemistry.

**Conclusions:** TU has an *in vitro* proliferative and anti-inflammatory effects on hDPSC and increased and promote the skeletal muscle differentiation moreover hDPSC represents a potential source of stem cells.

**Keywords:** Ultrasonic Therapy, Extracorporeal Shockwave Therapy, Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS), Adult Stem Cells, Dental Pulp Cells, Cell Differentiation.

## 1. Introducción

El músculo estriado es un tejido dinámico con alta capacidad de adaptación frente a estímulos fisiológicos, (1) constituye del 40 % al 45 % del peso corporal. Se integra de fibras musculares: roja oxidativa lenta (Tipo I), blanca oxidativa glucolítica rápida (Tipo IIA), glucolítica rápida (Tipo IIB), de igual manera existe un grupo de fibras llamadas IIC, raras en condiciones normales y se consideran fibras indiferenciadas capaces de convertirse en IIA o IB. (2) Las lesiones músculo-esqueléticas son sumamente frecuentes en la vida cotidiana y en la actividad deportiva, derivando en periodos de inactividad dependiendo del grado de la lesión desde leve, pasando por moderada, hasta severa. (3) Dentro de las lesiones musculoesqueléticas las más comunes son los desgarres, que se presentan en la unión miotendinosa, específicamente en músculos que presentan mayor cantidad de fibras tipo II es decir aquellos que son de contracción rápida como son los aductores, gastrocnemio interno, cuádriceps, recto anterior, isquiotibiales, entre otros. (3,4)

La fisiopatología en el músculo lesionado, independientemente de la causa de lesión encontramos las siguientes fases: destrucción, reparación y remodelación, estando las últimas dos sobrepuestas y relacionadas entre ellas, (5) el daño muscular ocasionado por desgarro o cirugía resulta en un déficit funcional (6) seguido de una secuela natural que sustituye el tejido contráctil por tejido patológico fibroso no contráctil, deteriorando cada vez más la capacidad funcional. (7)

Comprendiendo que el metabolismo celular está regulado por estímulos mecánicos y bioquímicos, existen diversos tipos de estimulación mecánica como ultrasonido a baja intensidad, centrifugación, aplicación de cargas estáticas, vibración, campo electromagnético, entre otros, que son reconocidos por las células después de un proceso de mecanotransducción que produce reacciones bioquímicas a partir del estímulo mecánico y así determinar una respuesta celular, (8,9) de esta manera el músculo esquelético puede completar una regeneración debido a las células troncales que residen en músculo esquelético y no esquelético.

Reportes han señalado que uno de los recursos capaces de promover la estimulación mecánica es el ultrasonido terapéutico (UT), utilizado ampliamente para diversos propósitos en ciencias de la

salud, como, por ejemplo, la osteogénesis. (9-11) Así mismo se reporta la utilización del UT en el campo clínico, basado en sus efectos biológicos que fomentan la activación celular, en proceso de curación de heridas por úlceras por presión (UPP), quirúrgicas, lesiones miotendinosas, consolidación de fracturas, entre otras. (8)

El ultrasonido es un tipo de sonido con una frecuencia mayor a la que puede percibir el oído humano, es decir mayor a 20,000 vibraciones por segundo Hertz (Hz), los dispositivos ultrasónicos han encontrado una gran aplicación en el hogar, la medicina, la industria y la oceanografía, (11) el UT tiene una frecuencia de 0.7 a 3.3 Mega-Hertz (MHz) con el objetivo de maximizar la absorción de energía a través de los tejidos. (12, 13)

La curación de heridas es un proceso complejo y organizado que restaura la integridad y la función del tejido dañado. (14) Restaurar la función a través de la barrera de la piel mediante reepitelización, revascularización, deposición de matriz/remodelación y contracción implican la interacción de diferentes tipos de células que incluyen células endoteliales (EC), células de músculo liso (SMC), plaquetas, células inflamatorias, miofibroblastos y queratinocitos. Estas células secretan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento placentario (PIGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e inhibidor tisular de las metaloproteinasas 2 (ITMP-2) entre otros factores para regular el proceso de curación y modular los componentes de la matriz extracelular. (15–17)

El uso de células troncales de pulpa dental humana (hDPSC) y su potencial diferenciación a diversos tejidos ha abierto un nuevo campo de investigación enfocado a la regeneración y a la estimulación del crecimiento de los vasos sanguíneos, factores críticos para el tratamiento exitoso de las heridas y la regeneración del músculo-esquelético. (18)

Se ha demostrado que el uso de células estromales mesenquimales (MSC) promueve la cicatrización de heridas a través de diferentes procesos, incluida la angiogénesis. (19) Existen diversas enfermedades o defectos musculares que son difícilmente tratados y actualmente no existen terapias que puedan regenerar por completo la degeneración muscular y vascular. En este sentido, la terapia con hDPSC se puede utilizar para restaurar lesiones de tejido muscular,

Sordo-Carrillo.

reparando así las fibras dañadas y previniendo la futura degeneración muscular que aunado al uso del UT puede marcar efectos benéficos en este campo de la investigación. (18,19)

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es conocer y reportar los efectos *in vitro* del UT en la proliferación, desinflamación y diferenciación miogénica de hDPSC utilizando distintos parámetros de tratamiento mediante la estimación de la viabilidad celular, la expresión de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y la expresión de actina a través de ensayos de reducción metabólica de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT), ensayos de ELISA y co-cultivo con hDPSC-C2C12 (Células de músculo esquelético de ratón) y su estudio por inmunocitoquímica, respectivamente.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Ultrasonido Terapéutico (UT)

El Ultrasonido es un tipo de sonido con una frecuencia mayor de 20.000 ciclos por segundo Hertz (Hz), basándose en la audición humana, el UT es el resultado de la transducción de la energía eléctrica en mecánica (piezoelectricidad), tiene un frecuencia de 0.7 a 3.3 Mega-Hertz (MHz) con el objetivo de maximizar la absorción de energía entre 2cm y 5 cm de tejidos blandos (12) compuesta de ondas alternantes de compresión y refracción produciendo así ondas ultrasónicas cuya energía dependerá de los parámetros de aplicación. (13,20)

#### **Comportamiento de las ondas mecánicas ultrasónicas:**

Las vibraciones moleculares transportan energía desde un transmisor a un receptor, cuando las moléculas se acercan entre sí se llama “compresión” y cuando se separan se llama “refracción”, esta es la base para llamar al sonido una onda mecánica. (21)

Es importante mencionar que, dado que el haz de ultrasonido no es homogéneo por todo el cabezal, se provocan interferencias y nódulos de potencia que convergen, se concentran y luego se difractan (Fig. 1), esto explica que:

- ✓ En el campo cercano o zona de Fresnel puede haber riesgos de lesión tisular por la compresión puntual.
- ✓ En el nodo de convergencia, aparece cavitación y daño tisular con frecuencia.
- ✓ A partir del nodo de convergencia o zona de Fraunhofer, el haz se vuelve homogéneo y está libre de riesgo. (22)



Sordo-Carrillo.

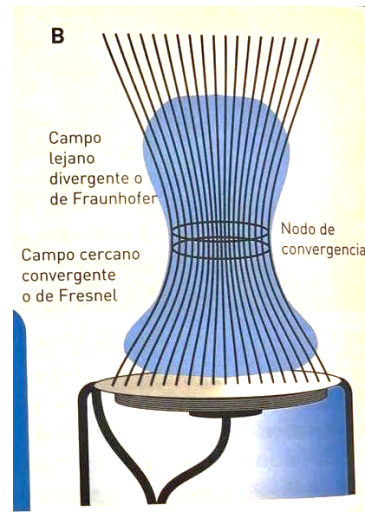


Fig. 1: Emisión de no homogeneidad del UT.  
Fuente: Rodríguez Martín. Electroterapia en Fisioterapia 2004.

**Atenuación:**

Es la disminución de la intensidad del ultrasonido, conforme atraviesa los tejidos. Cabe resaltar que existen tejidos que poseen un mayor coeficiente de absorción como son los huesos donde se provoca mayor temperatura interna, y en menor medida, el tejido muscular que posee menor coeficiente de absorción. (23) La atenuación es mayor en los tejidos con mayor cantidad de colágeno con la utilización de altas frecuencias de UT, mientras que los que tienen menor coeficiente, suelen tener alto contenido en agua, por el resultado de la absorción reflexión y refracción. Son específicos para cada tejido y frecuencia. (13) (Tabla 1)

Coeficiente de absorción en decibelios/centímetros a 1 y 3 MHz		
Tejido	1MHz	3MHz
Sangre	0,025	0,084
Grasa	0,14	0,42
Nervio	0,2	0,6
Musculo (Paralelo)	0,28	0,84
Musculo (Perpendicular)	0,76	2,28
Vasos sanguíneos	0,4	1,2
Piel	0,62	1,86
Tendón	1,12	3,36

## Efectos del ultrasonido terapéutico en cultivo con hDPSC

Sordo-Carrillo.

Cartilago	1,16	3,48
Hueso	3,22	-

Tabla 1: Coeficientes de absorción del UT.

Fuente: Michelle H. Cameron. Agentes Físicos en Rehabilitación 2013.

Se considera que la frecuencia de 1 MHz es más apropiada para llegar a tejidos de hasta 5 cm de profundidad bajo la piel, mientras que 3 MHz solo llega de 1 cm a 2 cm de profundidad. (13)

El UT se podría clasificar en la categoría de los agentes físicos térmicos y mecánicos de acuerdo a sus parámetros de uso, (12) los efectos biológicos de las ondas ultrasónicas se pueden agrupar en 5 categorías.

1. Rotación del protoplasma.
2. Desplazamiento de pequeñas partículas.
3. Lisis celular.
4. Desintegración de pequeños cuerpos como cloroplastos.
5. Estimulación celular. (24)

El UT puede tener diferentes parámetros de aplicación atendido a lo siguiente:

- Frecuencia: Cantidad de veces por segundo que vibra el aire para producir el sonido en un segundo, el rango de frecuencia de ultrasonido comienza a una frecuencia aproximada de 20 kHz, en UT se utilizan 1 MHz y 3 MHz. (21) (Fig. 2)

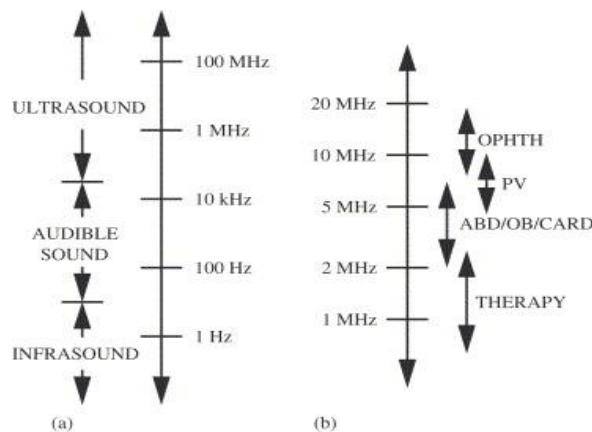


Fig. 2: (a) Espectro acústico (b) Espectro de UT.  
Fuente: O'Brien WD. Ultrasound-biophysics

Sordo-Carrillo.

- Intensidad: Dosimetría utilizada para el ultrasonido, cantidad de potencia utilizada en el bioefecto ultrasónico en las unidades  $W/cm^2$ . (21)
- Ciclo de trabajo: Relación entre la duración del impulso y el periodo de repetición del impulso, es decir, la cantidad fraccional del tiempo que se activa el pulso y se mide en porcentaje. (21).
- Área real de emisión del cabezal: Área en  $cm^2$  por la cual se emite energía ultrasónica con eficacia suficiente, también denominado "ERA". (22)
- Radio de no homogeneidad del haz de ultrasonido: El centro del cabezal del ultrasonido emite energía más potente que los bordes del cabezal, en la (Fig. 3) se observa el reparto de la energía transmitida por el cabezal del ultrasonido. (22)

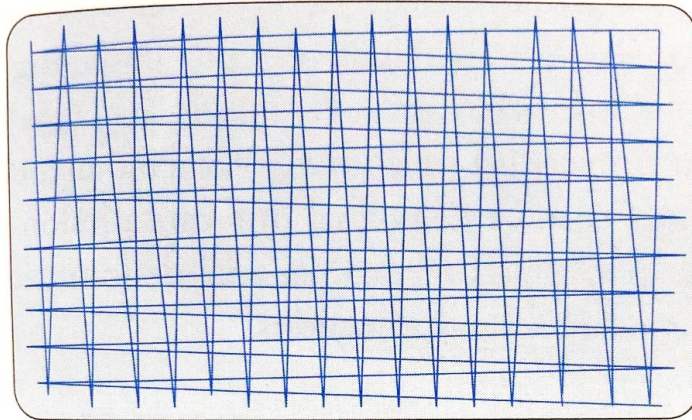


Fig. 3: Reparto de la energía transmitida por el cabezal del UT.  
Fuente: Rodríguez Martín. Electroterapia en Fisioterapia 2004.

**UT térmico:**

También llamado continuo, provoca efectos térmicos (Fig. 4) como el aumento de temperatura de los tejidos, tanto superficiales como profundos, estos se producen por ondas ultrasónicas continuas con suficiente intensidad, con el fin de aumentar el flujo de sangre, la tasa metabólica y la extensibilidad de los tejidos blandos. (12)

**UT no térmico:**

Se conoce también con el término pulsado, (Fig. 4) utilizado para facilitar la curación de los tejidos o favorecer la penetración transdérmica de los fármacos mediante mecanismos mecánicos. (13)

Existen cambios que pueden alterar la permeabilidad celular que son:

1. Cavitación: Es la formación, crecimiento y oscilación de burbujas de gas ocasionadas por el UT durante la compresión y refracción de la onda, (25) pueden ser:
  - Estables: Las burbujas de gas oscilan en su tamaño a lo largo de muchos ciclos, pero no estallan, se piensa que este tipo de cavitación puede ser el mecanismo de los efectos terapéuticos no térmicos del UT. (26)
  - Inestables: Las burbujas de gas crecen a lo largo de un número de ciclos y posteriormente implosionan ocasionando de manera breve, localizada e impactante, un aumento de presión y temperatura provocando radicales libres, al parecer este tipo de cavitación no se produce con las intensidades terapéuticas de ultrasonido. (26)
2. Microcorrientes: Son remolinos pequeños que se producen cerca de los objetos vibratorios, en el ultrasonido ocurren alrededor de las burbujas de gas que oscilan por la cavitación. (27)
3. Corriente acústica: Es el flujo continuo y circular de los fluidos celulares inducidos por ultrasonido, es más grande que las microcorrientes y se dice que produce cambios en la actividad celular al transportar sustancias a través del campo de ultrasonido. (27)

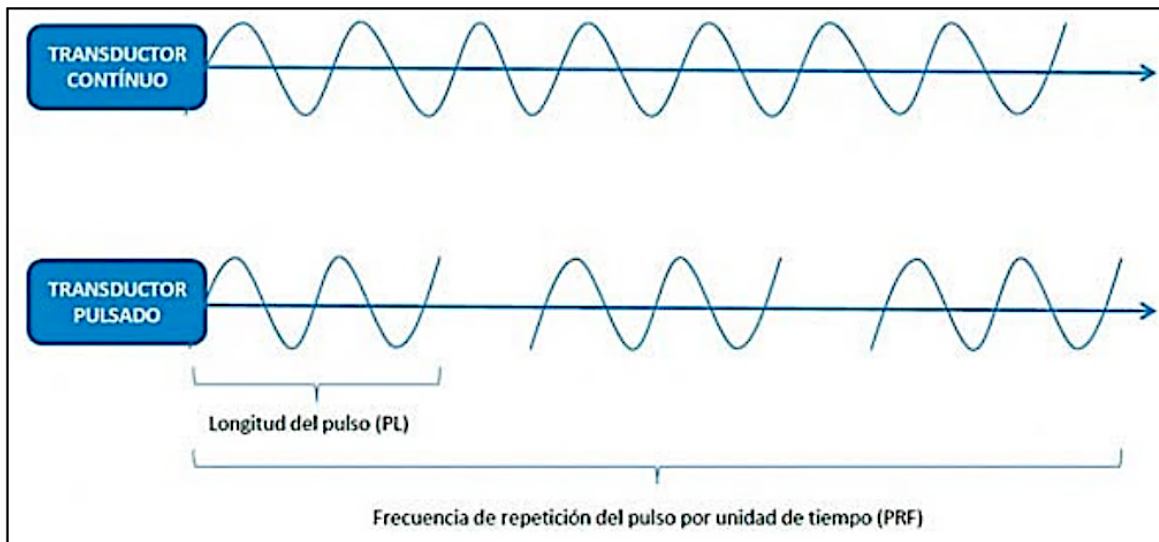


Fig. 4: Representación de onda de Ultrasonido continuo y pulsado.  
Fuente: jaioserrano.com. Ganadería 2015.

La clave de la versatilidad del ultrasonido en aplicaciones médicas y de la salud es su múltiple interacción con las células y tejidos, la simple presión oscilatoria que provoca, es captada y afecta las células y los tejidos provocando así efectos terapéuticos, (28) principalmente utilizada en lesiones musculares y sus diferentes tipos de fibras. (Tabla 2)

## Efectos del ultrasonido terapéutico en cultivo con hDPSC

Sordo-Carrillo.

	<b>Tipo I</b>	<b>Tipo IIA</b>	<b>Tipo IIB</b>	<b>Tipo IIC</b>
<b>Nombre</b>	Roja Oxidativa lenta	Blanca Oxidativa glucolítica rápida	Glucolítica rápida	**Fibras indiferenciadas capaces de convertirse en IIA o IIB, Raras en condiciones normales.
<b>Velocidad de contracción</b>	Lenta	Rápida	Rápida	
<b>Fuerza de contracción</b>	Baja	Alta	Alta	
<b>Fatigabilidad</b>	Resistencia a la fatiga	Fatigable	Muy Fatigable	
<b>Capacidad Aeróbica</b>	Alta	Moderada	Baja	
<b>Capacidad Anaeróbica</b>	Baja	Moderada	Alta	
<b>Tamaño de unidad motora</b>	Pequeño	Grande	Más Grande	
<b>Densidad capilar</b>	Alta	Alta	-	

Tabla 2: Tipos de fibras musculares y sus características fisiológicas.  
Fuente: Michelle H. Cameron. Agentes Físicos en Rehabilitación 2013.

Su efecto inicial era principalmente térmico, posteriormente se comenzó a utilizar para la reparación de tejidos, desinflamación y cicatrización de heridas. En los efectos no térmicos del ultrasonido podemos encontrar la reparación de fracturas que han sido estudiadas con resultados efectivos utilizando UT a baja intensidad relacionado directamente con la respuesta celular que provoca. (29)

Como ya se mencionó anteriormente la utilización de UT a dosis muy altas del rango terapéutico puede provocar daño tisular atribuido a los efectos de calentamiento y cavitación inercial. (30,31)

### Método de aplicación del UT

Para la aplicación de UT es necesario utilizar un transmisor de la onda que puede ser agua (subacuático) (Fig. 5C), interponer entre la piel y el cabezal una bolsa de látex llena de agua y sin burbujas (Fig. 5B) o utilizar un gel de ultrasonido (Fig. 5A) que es una sustancia soluble en agua utilizada para completar un circuito, para unir una salida a la piel; el gel de ultrasonido permite pasar la onda ultrasónica hasta la piel, sin ello no sería posible debido a la gran impedancia acústica del aire al paso de la frecuencia de MHz del ultrasonido. (22,32) El gel debe contar con las siguientes características:

- ✓ Ser un buen conductor de ondas de ultrasonido.
- ✓ Facilitar el deslizamiento del cabezal.
- ✓ No researse o formar grumos.
- ✓ No irritar la piel. (22)

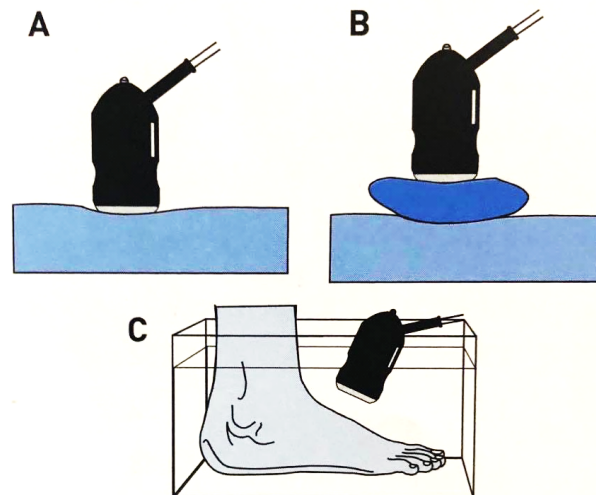


Fig. 5: Aplicación de UT. A) Directa con gel transductor. B) A través de una bolsa con agua. C) Subacuática.  
Fuente: Rodríguez Martín. Electroterapia en Fisioterapia 2004.

Los efectos biológicos del UT, se han reportado en la literatura tanto del UT térmico como el no térmico y han sido estudiados de manera *in vitro* por diversos autores en cultivos celulares de diferentes linajes. (33,34)

## 2.2 Cultivo celular

Es el conjunto de técnicas que permiten el máximo mantenimiento de propiedades fisiológicas, bioquímica y genéticas de las células *in vitro*. (35)

Los cultivos celulares tienen diferentes usos para el estudio de células específicas, es decir, investigar cómo y cuándo crecen o cómo y cuándo dejan de crecer, su estructura bioquímica, entre otros.

Se pueden destacar:

- Estudios virológicos.
- Investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética.
- Estudios de interacción/señalización celular.
- Búsqueda de modelos experimentales para estudios de la biología del desarrollo y la diferenciación celular.
- Estudios de biocompatibilidad. (35–37)

Las células de humanos pueden ser obtenidas mediante biopsias, post-mortem, de placenta o de procedimientos quirúrgicos y se pueden cultivar mediante una amplia gama de cultivos celulares para la investigación. (36)

Existen diferentes tipos de cultivo celular dependiendo su forma de cultivo, estos son:

- **Cultivo primario:** Son cultivos que provienen de células que han sido disgregadas de un tejido original, este puede ser tomado después de un procedimiento quirúrgico o bien post-mortem, las células de un cultivo primario conservan la morfología celular del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide, su crecimiento *in vitro* es



Sordo-Carrillo.

limitado y hay inhibición por contacto debido a que están más cercanas a las células que las originaron; una de las desventajas de este tipo de cultivos es que existe una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad. (36)

- **Línea celular continua**: Se denomina así cuando un cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfixión con oncogenes o tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación y puede inducirse fisiológicamente por interacción celular, polaridad a través de hormonas o utilizando inductores no fisiológicos como el dimetilsulfóxido (DMSO). (38)
- **Línea celular de cultivo primario**: Se denomina así a un cultivo primario cuando este es subcultivado, presenta una reducción en el número de células a través del tiempo. (39)
- **Co-cultivo**: Es la configuración de un cultivo celular en la cual dos o más poblaciones diferentes de células crecen con cierto contacto entre ellas, se utilizan para discernir los efectos individuales y colectivos del contacto físico o con ciertos objetivos como: estudiar sus interacciones naturales, mejorar el éxito de algún cultivo para ciertas poblaciones o establecer interacciones sintéticas entre poblaciones celulares como infecciones e investigación en fármacos. (39,40)

Para el aislamiento celular de tejidos en cultivos *in vitro* existen diferentes técnicas con las cuáles se pueden obtener células primarias o cultivos primarios que se cultivan directamente desde un sujeto, normalmente tiene un periodo de vida limitado debido a la división celular. (41)

Para el mantenimiento de las células, los cultivos deben ser mantenidos a una temperatura y medio ambiente adecuados, el cual es de 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad en una incubadora celular, a menudo los factores utilizados para suplementar el crecimiento celular derivan de sangre animal como el suero bovino (SFB). (41,42)

Con el objetivo de renovar los nutrientes, evitar la acumulación de productos metabólicos tóxicos y células muertas, se requiere de un cambio de medio de cultivo, en cultivos adherentes al plato de cultivo, se retira directamente el medio por aspiración y se reemplaza por uno fresco. (36,37,43)

Para realizar los subcultivos, es decir, transferir un pequeño número de células a un nuevo contenedor con el fin de evitar la muerte celular por sobrepoblación, con cultivos en suspensión se realiza tomando una pequeña cantidad de cultivo con células diluyéndola en un volumen mayor de medio fresco, en cultivos adherentes, las células inicialmente deben de ser despegadas con una mezcla de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o alguna otra sustancia especializada y posteriormente realizar el traspaso celular en el nuevo recipiente. (36,37)

Las técnicas de cultivo celular precisan estrictas condiciones de asepsia ya que el crecimiento de las células animales no es tan rápido como los contaminantes comunes (bacterias, mohos y levaduras), además de que no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que hay que agregar medios suplementarios como suero, plasma y fluidos intersticiales para proveer a las células un medio semejante al *in vivo*. (35,42)

Los costos de realizar experimentación en cultivo, es diez veces mayor que realizarlo en tejidos animales ya que se invierte en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso. (37)

En los cultivos celulares es difícil relacionar las células cultivadas con las células funcionales del tejido que son derivadas, ya que en la mayoría de los casos presentan propiedades diferentes, debido a esto se utilizan marcadores celulares al momento de caracterizarlas y así garantizar que las células crecidas en el cultivo sean iguales a las que se cultivaron inicialmente, otra dificultad es la inestabilidad genética cuando se realizan varios pases de cultivos celulares no transformadas, lo que originará una enorme heterogeneidad de las células y su diferenciación. (37)

### **Células troncales para la regeneración de tejidos**

Hasta hoy en día se han descubierto células mesenquimales provenientes de distintos tejidos como son: tejido adiposo, sangre periférica, bazo, cerebro, líquido sinovial, dermis, músculo, pulpa dental, cordón umbilical, piel, córnea, retina, hígado, páncreas e intestinos. (44)

La regeneración tisular se ha convertido en un campo de investigación, tiene propósitos específicos en el ámbito clínico, las células madre pluripotenciales humanas se diferencian y se renuevan en diferentes tipos de células convirtiéndose en una manera llamativa hacia la investigación para tratar distintas enfermedades mediante el reemplazo celular. (45)

Las células madre se caracterizan principalmente por su capacidad ilimitada de dividirse, hay una gran cantidad de células madre específicas que pueden ser tratadas *in vitro* para inducir su diferenciación hacia un tejido específico, se sabe mediante estudios realizados que las células multipotenciales estromales de medula ósea tienen una potencial capacidad para diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos, incluso tejido neural y muscular. (46,47)

### **Células troncales de la pulpa dental humana (hDPSC)**

La pulpa dental humana se deriva de la capa germinal denominada mesoderma, se ha demostrado que tiene capacidad clonogénica, proliferativa, de auto regeneración así como un patrón de marcadores específicos y capacidad multipotente, las hDPSC tienen las propiedades de las denominadas células madre adultas, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) por sus siglas en inglés dice que una célula madre mesenquimal debe de:

- Adherirse al plato de cultivo en condiciones de un cultivo estándar.
- Expresar ( $\geq 95\%$ ) CD105, CD73, CD90.
- No expresar ( $\leq 2\%$ ) CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 $\alpha$  o CD19, HLA-DR.
- Dar al menos tres linajes diferenciados: osteoblástico, adipogénico y condroblástico.

Este último punto se demuestra mediante la tinción de el cultivo celular diferenciado de manera *in vitro*. (44)

La pulpa dental tiene 4 capas: 1) Capa externa que contiene odontoblastos, 2) Zona libre de células, 3) Zona rica en células y 4) Núcleo de la pulpa, obteniéndose de la tercer capa las hDPSC que son una fuente accesible de células progenitoras que tienen la capacidad de diferenciarse a distintos linajes celulares debido a su capacidad plástica. Se sabe que en ciertas condiciones *in vitro* pueden formar una apariencia similar a un odontoblasto y se especula que también pueden tener una potencial capacidad para diferenciarse en otros tejidos mediante las condiciones adecuadas, se sabe que los factores mecánicos y bioquímicos influyen entre la renovación y la diferenciación de hDPSC *in vitro*, estas células pueden ser fácilmente crioconservadas, almacenadas y aun así conservar su capacidad de multipotencia. (47–49)

Investigaciones han referido resultados benéficos en la diferenciación celular utilizando un tratamiento previo con DMSO mejorando la eficiencia de la diferenciación. (50)

### 2.3 Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular se define como el número de células sanas en una muestra, mientras que la proliferación celular es un indicador vital para comprender los mecanismos en acción de ciertos genes, proteínas y vías implicadas en la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes tóxicos. Generalmente, los métodos usados para determinar la viabilidad son también comunes para la detección de la proliferación celular.

Existe una variedad de métodos de ensayo basados en células que se enfocan en diversas funciones celulares tales como actividad enzimática, permeabilidad de la membrana celular, adherencia celular, producción de ATP, producción de co-enzimas y actividad de captación de nucleótidos. Estos métodos podrían clasificarse básicamente en diferentes categorías: (I) Métodos de exclusión de colorantes tales como ensayo de exclusión de colorante azul de tripano, (II) Métodos basados en actividad metabólica, (III) Ensayos de viabilidad de celdas múltiples, (IV) Ensayo de sulforhodamina B y de supervivencia celular clonogénica, (V) Ensayo de marcadores de viabilidad, (VI) Ensayos de proliferación celular de síntesis de ADN y (VII) Microespectroscopía de Raman. (13)

**(I). Métodos de exclusión de colorantes tales como ensayo de exclusión de colorante azul de tripano**

Esta técnica ha sido la metodología estándar utilizada en los laboratorios de investigación académica y en las plantas de biotecnología industrial. Las células se contaban rutinariamente de manera manual con un hemocitómetro. El método tradicional se realiza para la identificación del análisis de viabilidad de las células con azul de tripano que implica una tinción manual y el uso de un hemocitómetro para su recuento. (51,52)

**(II). Métodos basados en actividad metabólica**

El primer colorante metabólico, probablemente el más conocido, es el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El ensayo de reducción de MTT se usa para determinar el nivel de actividad metabólica en células eucariotas, incluyendo células animales, vegetales y fúngicas. Si la tasa metabólica es constante, la técnica puede emplearse para contar células vivas en una muestra. (53) Este ensayo se basa en la conversión por reducción de tetrazolio soluble en cristales de formazán azul que se da en las mitocondrias. Otros colorantes similares se han vuelto cada vez más populares, tales como XTT (Sodio 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) ácido benceno sulfónico hidrato), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), y derivados de WST, XTT y MTS se utilizan en presencia de fenazina metosulfato (PMS) que aumenta su sensibilidad. (54) Estos ensayos son considerados más sensibles y rápidos, pero su principal ventaja es que tienen menos pasos a medida que el producto convertido se libera en el medio, lo que significa que no se requiere ningún paso para disolver el producto insoluble (una etapa necesaria cuando se usa MTT); sin embargo, el ensayo de MTT es metabolizado por la mayoría de los tipos de células, mientras que algunas de las nuevas alternativas no son adecuadas para todas las células. (55,56)

### **(III). Ensayos de viabilidad de celdas múltiples**

Los investigadores pretenden obtener el mayor número posible de datos de una muestra de células para comprender los procesos biológicos del objeto de estudio. Los ensayos múltiples cumplen este objetivo ya que tienen la capacidad de reunir más de un dato de la misma muestra.

Para determinar la mortalidad celular, se utiliza el valor de LC50 (es decir, la concentración que mata el 50 % de las células) a partir del ensayo de viabilidad celular, que se basa en la reducción de resazurina en un producto final fluorescente. La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) y aspartato aminotransferasa (AST) se utilizan como marcador para la integridad de la membrana.

(57) Para investigar el mecanismo de la muerte celular (apoptosis versus necrosis), la actividad caspasa-3/7 se midió como marcador de apoptosis, mientras que la necrosis se asocia más con la liberación de LDH y AST. GLDH, una enzima específica del hígado que se encuentra exclusivamente en la matriz mitocondrial, (58) también se ha utilizado para determinar el efecto de los medicamentos sobre las mitocondrias.

### **(IV). Ensayo de sulforhodamina B y de supervivencia celular clonogénica**

Los dos ensayos *in vitro* usados comúnmente son el ensayo de sulforodamina B (SRB) y el ensayo de supervivencia clonogénica que pueden utilizarse para monitorizar la eficacia de agentes anticancerosos, ya sea mediante citotoxicidad directa de células tumorales o mecanismos antiangiogénicos. Las técnicas descritas son adecuadas para estudiar la supervivencia en una serie de diferentes tipos de células y no requiere de ningún equipo especializado. El ensayo clonogénico se ha convertido en uno de los ensayos más utilizados y confiables para evaluar la sensibilidad celular a los tratamientos citotóxicos, ya que prueba el aspecto fundamental de la supervivencia y la proliferación celular. (59) Es ampliamente utilizado para la evaluación de la radiosensibilidad, ya que puede evaluar con precisión los efectos a largo plazo de supervivencia de la irradiación. También se utiliza para evaluar la eficacia de los nuevos fármacos contra el cáncer. El ensayo clonogénico es aplicable para su uso con cualquier tipo de célula. (60) Debido a su gran rango dinámico, es bueno para realizar ensayos con un bajo y alto número de densidad celular, aspecto limitante en ensayos colorimétricos y basados en la exclusión de colorantes.

Sordo-Carrillo.

Al comparar SRB y ensayos clonogénicos, este último es más laborioso y requiere mucho tiempo (tanto en términos de realización del ensayo como en la generación de resultados, es decir, las placas tienen que ser incubadas durante 2-4 semanas), y pueden surgir problemas con líneas celulares que no se disocian fácilmente en una sola suspensión de células. (60-61)

El ensayo SRB es un popular ensayo de citotoxicidad *in vitro* desarrollado por Skehan y cols. (61) SRB es un colorante de aminoxanteno que se une a los residuos de aminoácidos básicos en las proteínas a través de sus grupos sulfónicos. La unión de SRB es estequiométrica; por lo tanto a cantidad de cambio colorimétrico da una estimación de la masa total de proteína, que es directamente proporcional al número de células. (62) Como se mencionó anteriormente, la aplicación principal del ensayo de SRB está en las pruebas de quimiosensibilidad, ya que es particularmente adaptable y adecuado para sistemas de alto rendimiento tales como el cribado de fármacos. Para los ensayos de sensibilidad a la radio, a menudo se cree que los ensayos colorimétricos son inadecuados debido a la corta duración del ensayo; sin embargo, se ha informado, que si el ensayo SRB se deja suficiente tiempo para permitir la muerte celular retardada inducida por radiación (es decir, se deja el equivalente de seis tiempos de duplicación de células o el tiempo equivalente que tomaría para que las células formen colonias de más de 50 células en un ensayo clonogénico) pueden obtenerse curvas de supervivencia comparables. (60) Se debe tener precaución antes de la aplicación de este ensayo para las mediciones de radiosensibilidad, ya que todavía hay cierta preocupación de que en ciertas dosis, es decir, alta (> 6 Gy) o baja (< 2 Gy) sea insensible, es decir, estima la supervivencia en comparación con el ensayo clonogénico. (63)

#### **(V). Ensayo de marcadores de viabilidad**

El ensayo Alamar Blue se basa en la reducción enzimática del marcador de viabilidad de células vivas y sirve como una herramienta eficaz para evaluar la proliferación celular y como una técnica de cribado. Puede aplicarse en estudios que se concentran en células de animales, plantas, levaduras y bacterias. En el interior de la célula, Alamar Blue experimenta una reducción enzimática en las mitocondrias debido a la actividad de enzimas tales como: flavina mononucleótida deshidrogenasa, flavina adenín dinucleótida deshidrogenasa, nicotinamida

adenina deshidrogenasa y citocromos. (64) También se observa que las enzimas citosólicas y microsómicas tienen la capacidad de reducir la resazurina. Por otra parte, la magnitud de la reducción mitocondrial es similar a la reducción citosólica impulsada por NADPH: quinina oxidoreductasa, flavina reductasa y citocromos. (65,66) El resorufin rojo se excreta fuera de las células al medio dando como resultado un cambio de color visible de azul a rosa. Por lo tanto, la tasa de reducción basada en el cambio de color, que se puede cuantificar colorimétricamente o fluorométricamente, refleja el número de células viables. Alamar Blue es muy sensible y, dependiendo del tipo de célula y el tiempo de incubación, es lineal en el rango de 50-50.000 células en una placa de 96 pocillos. (66)

### **(VI) Ensayos de proliferación celular de síntesis de ADN**

El ensayo del cometa es un método basado en electroforesis en gel que puede usarse para medir el daño del ADN en células eucariotas individuales, es versátil, relativamente simple de realizar y sensible. Aunque la mayoría de las investigaciones hacen uso de su capacidad para medir rupturas de una sola cadena de ADN, las modificaciones en el método permiten la detección de rupturas de doble hebra de ADN, enlaces cruzados, daño base y núcleos apoptóticos. El límite de sensibilidad es de aproximadamente 50 rupturas de hilos por célula diploide de mamífero. El daño del ADN y su reparación en suspensiones monocelulares preparadas a partir de levaduras, protozoos, plantas, invertebrados y mamíferos también se pueden estudiar usando este ensayo. Desde el desarrollo inicial del ensayo cometa, se han realizado esfuerzos para mejorar la sensibilidad y fiabilidad del ensayo, extender las aplicaciones al análisis de diversos tipos de daño del ADN en varios tipos de células, (67) aumentar la capacidad de manipulación de muestras (68) y estandarizar los protocolos y el análisis. (69) Los esfuerzos para optimizar la concentración de agarosa, los tampones de lisis y las manchas de ADN fueron llevados a cabo por varios grupos. (70) Se introdujo una versión del método en condiciones neutras que permitió detectar fracturas de doble hebra de ADN independientes de la presencia de roturas de una sola hebra. (71) El daño de la base se ha logrado identificar mediante la incubación de células lisadas con endonucleasas específicas de daño base antes de la electroforesis. Los enlaces cruzados interconectados podrían



Sordo-Carrillo.

identificarse por la falta de detección de roturas de una sola cadena que se sabe que están presentes. (72) La fragmentación extensa del ADN que ocurre en las células apoptóticas hizo que estas células fueran fáciles de detectar. (73) La importancia de la heterogeneidad en el daño del ADN en la explicación de la resistencia al tratamiento del cáncer se demostró posteriormente en células de modelos de tumor animal y biopsias clínicas. El potencial para predecir la respuesta tumoral a tratamientos específicos que causan daño al ADN ha sido demostrado. (74)

### **(VII) Microespectroscopía de Raman**

El número de técnicas para identificar, cuantificar y caracterizar la muerte celular está aumentando rápidamente a medida que se conoce más acerca de los mecanismos complejos que subyacen a este proceso. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas son invasivas y requieren pasos de preparación tales como tinción o extracciones de proteínas. El análisis no invasivo de células vivas representa un punto clave en la biología celular en estudios de toxicología o en ingeniería de tejidos. La espectroscopia Raman es una herramienta analítica bien establecida y se basa en la interacción de la radiación electromagnética con las moléculas de la muestra. Un espectro Raman representa un análisis químico de la muestra, basado en láser de infrarrojo cercano dirigido a través de una serie de espejos por medio de un microscopio sobre la muestra, dando lugar a la dispersión de la luz que interactúa con una pequeña porción de los fotones dispersos con una frecuencia cambiada. Cada enlace químico da como resultado un cambio de frecuencia definido de los fotones. Por ejemplo, un desplazamiento Raman de  $1.005 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a la fenilalanina, la intensidad del pico es relativa a la concentración. (75) Esta técnica tiene tres ventajas principales sobre los ensayos biológicos convencionales cuando se aplica al estudio de células vivas: (76) i) es rápida (1-3 minutos), ii) no invasiva y iii) no se induce ningún daño a las células si se usan longitudes de onda e intensidades de láser adecuadas.

La espectroscopia Raman ha demostrado ser capaz de detectar cambios biológicos in situ y en tiempo real relacionados con el ciclo celular y la muerte celular. (77,78) Mediante la medición de la magnitud de la banda de Raman de  $782\text{-}788 \text{ cm}^{-1}$  de ADN, la distribución del ADN se ha representado en células apoptóticas, mostrando la fragmentación del núcleo. (79)

### **Inmunocitoquímica**

Una molécula en una célula o en un corte de tejido se puede encontrar por medio de compuestos específicos que interactúan y se unen a la molécula que queremos detectar, estos compuestos necesitan ser acoplados a un marcador para que puedan ser visibles al microscopio óptico o electrónico. Cuando el marcador está acoplado a una sustancia con afinidad específica por una molécula, delata la presencia de esa molécula, suelen ser sustancias fluorescentes, átomos radioactivos, moléculas de enzimas como la peroxidasa, metales, entre otros. La inmunocitoquímica es un tipo de interacción muy específica entre moléculas, se produce entre una molécula y un anticuerpo que la reconoce en un corte o en células de cultivo, es de gran utilidad para localizar proteínas y glucoproteínas. (41)

En una reacción inmunocitoquímica las células de un cultivo que se supone que tiene una determinada proteína, se incuban en una solución con el anticuerpo que reconoce dicha proteína (el anticuerpo fue acoplado previamente con un marcador para que sea visible) así el anticuerpo se une específicamente a la proteína y su localización se puede observar bajo el microscopio. Es una técnica que gracias a la oferta comercial de anticuerpos y la estandarización del protocolo se ha convertido en un método sencillo, rápido, potente con gran especificidad y una alta afinidad para detectar marcadores positivos de diferenciación celular. (41)

Es así como algunos de los diversos ensayos mencionados anteriormente aplicados en métodos *in vitro*, brindan información acerca del estado del estado biológico celular como puede ser presencia de marcadores, inflamación, viabilidad, entre otras. (41,58)

### **2.4 Inflamación**

Es una reacción de defensa que se manifiesta ante cualquier tipo de lesión, es un proceso complejo que se presenta como respuesta a infecciones o a diversos estímulos generadores de lesión tisular con el objetivo de adaptar al organismo a circunstancias anormales, es benéfica si es breve y localizada en el sitio del daño, de lo contrario se considera patológica. (80) La

Sordo-Carrillo.

prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) pertenece a la familia de productos de oxigenación del ácido araquidónico que se encuentra en el endotelio durante la inflamación aguda principalmente, este influye en la respuesta inflamatoria y la hiperalgesia, sensibilizando los nociceptores aferentes e induciendo liberación de sustancia P. (81)

La lesión de tejidos vascularizados provoca una serie de eventos coordinados, complejos y dinámicos para así lograr la reparación y restauración de la función. La inflamación se caracteriza por cuatro signos cardinales según Cornelio Celso (calor, rubor, tumor y dolor), (12) aunque más tarde Virchow añadió un quinto signo cardinal (\*\*pérdida de la función), (12,81) que se resumen en la Tabla 3:

<b>Signo (Español)</b>	<b>Signo (Latín)</b>	<b>Causa</b>
<b>Calor</b>	Calor	Aumento de la vascularización
<b>Enrojecimiento</b>	Rubor	Aumento de la vascularización
<b>Edema</b>	Tumor	Bloqueo del drenaje linfático
<b>Dolor</b>	Dolor	Presión física o irritación química de las estructuras
<b>**Pérdida de la función</b>	Functio laesa	Dolor y edema

Tabla 3: Signos cardinales de la inflamación.  
Fuente: Michelle H. Cameron. Agentes Físicos en Rehabilitación 2014.

El proceso de inflamación (Tabla 4) consta de 3 fases principales:

1. Inflamación: De los días 1 a 3, algunos autores refieren que puede llegar hasta el día 6 donde se prepara la herida para la curación.

2. Proliferación: De los días 3 al 20, reconstruye las estructuras y fortalece la herida.
3. Maduración: Del día 9 en adelante, modifica el tejido cicatricial hacia su forma madura.

La duración de estas fases normalmente varía de acuerdo con la lesión y al organismo del individuo y suelen ocurrir algunas simultáneamente. (12)

Sordo-Carrillo.

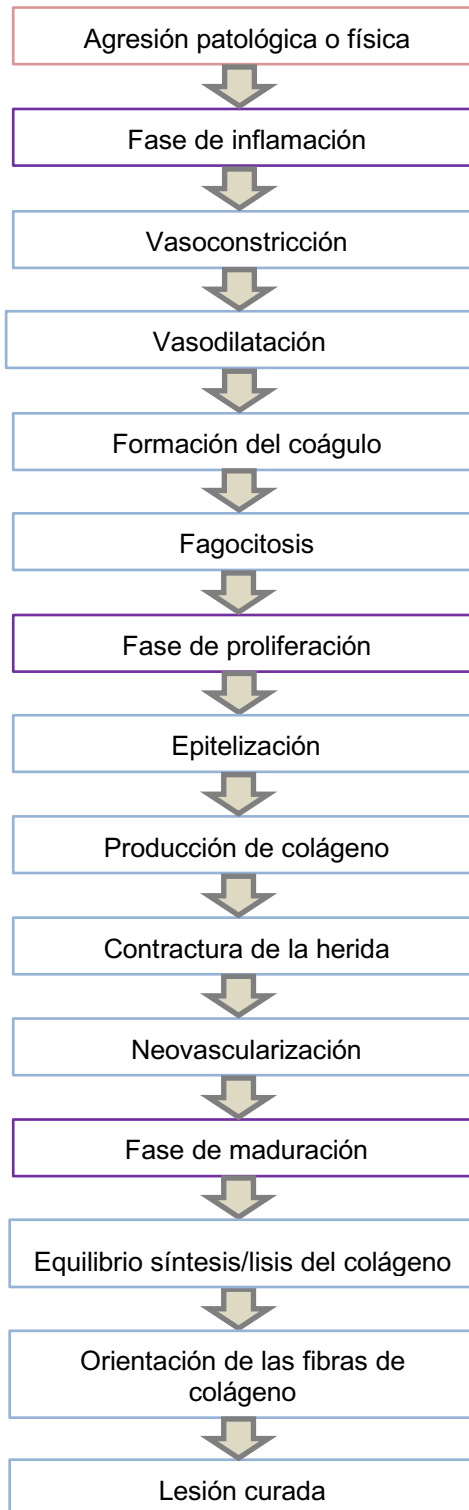


Tabla 4: Fases de la inflamación.

Fuente: Michelle H. Cameron. Agentes Físicos en Rehabilitación 2014.

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Antecedentes históricos del ultrasonido

Desde el siglo XIX estuvieron disponibles en Estados Unidos los métodos para generar y detectar ondas ultrasónicas, siendo la primera aplicación a gran escala durante la segunda guerra mundial con fines de navegación y cálculo de distancias a través de submarinos. (82) La aplicación del UT ha sido ampliamente utilizada por sus efectos térmicos, pero se han argumentado más recientemente los efectos "no térmicos" ya que esta forma de energía también es efectiva. (83) Desde entonces ha ido diversificándose para uso médico (imagenología, diagnóstico, entre otros), tomando en cuenta los efectos térmicos que puede provocar y los daños que puede conllevar su uso inadecuado, durante los últimos 50 años se ha extendido su uso clínico general y en los últimos 20 años se han observado y reportado los efectos no térmicos del ultrasonido. (82,83)

La capacidad del UT en interacción con los tejidos para producir cambios biológicos se conoce desde tiempo atrás, (84) en la actualidad es uno de los métodos más utilizados clínicamente en fisioterapia, (85) sin embargo el potencial terapéutico del ultrasonido aún está lejos de ser del todo establecido, ya que regularmente se agregan nuevas aplicaciones a su repertorio, (28) así como el desarrollo de nuevos materiales compuestos para producir frecuencias de UT de manera más eficiente y precisa. (86)

El efecto termal del UT, es decir la elevación de la temperatura de un tejido se da principalmente por la intensidad en la que se aplica, diversos enfoques demuestran la dependencia de la elevación de la temperatura en la intensidad aplicada, así mismo la conductividad térmica es propiedad del medio ya que varía según cada tejido y no se puede influir de manera significativa. (87)

En experimentos realizados sobre tibias de cadáveres humanos, se ha descubierto que los efectos del ultrasonido a baja intensidad (LIPUS) por sus siglas en inglés, se pueden obtener con una frecuencia de 1MHz, ya que el hueso responde a estímulos mecánicos y así provocar efectos de micromovimiento. (29)

Sordo-Carrillo.

En cuanto a la fonoforesis, en 1945 se tiene registrado el primer documento con la utilización de UT en esta modalidad, (88) posteriormente en 1963 Griffin *et al.* publicaron estudios donde se evaluaba la profundidad de la administración de cortisona y sus efectos al modificar la dosificación del UT. (89,90)

### 3.2 Antecedentes de los cultivos celulares

Año	Autor	Antecedente
1866	Rechlinhausen	Mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio.
1885	Wilhem Roux	Mantuvo células de embrión de pollo en solución salina durante unos días.
1907	Harrison	Empleó técnicas <i>in vitro</i> para el estudio de fenómenos <i>in vivo</i> , realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios.
1913	Burrows y Carrel	Demostraron que la vida de los cultivos celulares se puede prolongar mediante subcultivos.
1913	Carrel	Demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal.
1916	Rous y Jones	Emplearon por primera vez extractos enriquecidos en tripsina para disociar células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que hoy día se siguen utilizando.
1952	Gey y cols.	Establecieron la primera línea celular humana, las células

## Efectos del ultrasonido terapéutico en cultivo con hDPSC

Sordo-Carrillo.

		HeLa, extraídas a partir de un tumor de cuello del útero de una paciente afroamericana que se llamaba Henrietta Lacks.
<b>1965</b>	Bartell and Klein	Utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células <i>in vitro</i> .
<b>1975</b>	Kohler y Milstein	Establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales. El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel.
<b>1976</b>	Sato y cols.	Publican una serie de trabajos que demuestran las distintas necesidades de hormonas y factores de crecimiento que precisan diferentes líneas celulares.
<b>1986</b>	Martín y Evans	Aíslan y cultivan células madre embrionarias pluripotenciales de ratón.
<b>1998</b>	Thomson y Gearhart	Aíslan células madre embrionarias humanas.
<b>2007</b>	Takahashi y cols.	Reprograman células adultas de humano para convertirlas en células pluripotenciales inducidas.

Fuente: Davis JM, Basic Cell Culture 2002. Sons F, Culture of animal Cells: A manual of basic technique 2000. Arias J. Técnicas Básicas en Cultivos Celulares 2012.

Muchos de los estudios *in vitro* surgieron para sustituir o evitar la experimentación en animales y las cuestiones éticas que esto conlleva, se consideran buenos todos los métodos *in vitro* que cumplan con los postulados del principio de las tres "R":

1. Reemplazar los animales de experimentación por otros métodos que impliquen su uso.
2. Reducir su número cuando sea necesario utilizarlos.
3. Refinar las técnicas para aminorar su sufrimiento. (91,92)



### 3.3 Antecedentes de células troncales para la regeneración de tejidos

La utilización del UT sobre tejidos y células se ha estudiado en los últimos años gracias a los efectos mecánicos que provoca en ellos, se ha estudiado su uso sobre hDPSC con diferentes dosificaciones para intentar obtener los que provocan mayores beneficios y potenciar la diferenciación celular hacia otros tejidos. (93) De igual manera el LIPUS ha sido comparado en distintos tipos de células madre (pulpa, ligamento periodontal y médula ósea) para observar sus efectos *in vitro* y demostrar sus beneficios en la proliferación y diferenciación celular. (94) Por otro lado, se ha utilizado el UT en conjunto con cardiomiocitos derivados de células madre humanas y en los últimos años se han realizado diversas investigación con resultados prometedores vertidos en pocos reportes obtenido resultados inconclusos. (95)

### 3.4 Antecedentes de células troncales de la pulpa dental humana (hDPSC)

En los últimos años se han estudiado las hDPSC de una manera más específica logrando los siguientes hallazgos:

Año	Autor	Antecedente
2008	Huang <i>et al.</i>	Promovió la proliferación y diferenciación de células neurales en el hipocampo de ratones.
2008	Ikeda <i>et al.</i>	Lograron prevenir la progresión de la fibrosis hepática y contribuir a la restauración de la función hepática en ratas.
2008	Gandia <i>et al.</i>	Redujeron el área de infarto de miocardio, mejoraron la función ventricular e indujeron la revascularización mediante inyección intra-cardíaca.
2008	Iohara <i>et al.</i>	Incorporaron y estimularon la angiogénesis y la vasculogénesis en

## Efectos del ultrasonido terapéutico en cultivo con hDPSC

Sordo-Carrillo.

		modelos de isquemia de la extremidad posterior en ratones.
<b>2008</b>	Kerkis <i>et al.</i>	Lograron migrar, ingresar y muestrear un potencial miogénico cuando se inyectaba en perros (golden retriever) con distrofia muscular.
<b>2009</b>	Siqueira da Fonseca <i>et al.</i>	Contribución al desarrollo de embriones de ratones.
<b>2010</b>	Gomes <i>et al.</i>	Lograron reconstruir el epitelio corneal en un modelo de deficiencia total de células madre del limbo.
<b>2010</b>	Yamada <i>et al.</i>	Formación de hueso cuando se combina con plasma rico en plaquetas o hidroxiapatita.
<b>2006/2010</b>	Huang <i>et al./Yamada et al.</i>	Estudiaron la reparación de defectos calvariales de tamaño crítico en ratones inmunocomprometidos.
<b>2011</b>	Yildirim <i>et al.</i>	Lograron generar estructuras dentales.

Fuente: Yildirim S. Dental Pulp Stem Cells (DPSC) 2013.

#### 4. Planteamiento del Problema

Las lesiones músculo-esqueléticas conllevan a una alteración en la función del individuo en el área lesionada, la fisioterapia ayuda a mejorar la funcionalidad, a pesar de que no se cuenta con un método quirúrgico o rehabilitatorio estandarizado para la pérdida de tejido y volumen muscular, (96) es necesario la intervención y el tratamiento desde diferentes enfoques con el fin de aminorar el déficit funcional progresivo relacionado con las lesiones musculares. (97)

Mendonca *et al.* (98) dice que el UT promueve efectos benéficos en los tejidos como angiogénesis, aumento en el número de fibroblastos, síntesis de colágeno, disminución de leucocitos y macrófagos, aumentando así la velocidad de cicatrización de heridas, disminuyendo las células inflamatorias y mejorando la calidad del tejido que se está formando, sin embargo, todavía son escasas las evidencias científicas y contradictorias para determinar de forma fiable la dosificación y la metodología necesarias para lograr estos objetivos. (30,99)

Existen muchas variables a considerar durante la aplicación de UT, por ejemplo, el grosor de la capa de tejido, el volumen de flujo sanguíneo, la distancia entre tejidos blandos y óseos que son reflectantes y la variabilidad de equipos utilizados para la aplicación de UT, eso varía la predicción de los parámetros a utilizar. (100)

Por lo antes mencionado, en vista de la diversidad de resultados obtenidos en las investigaciones actuales y la inexactitud de parámetros a utilizar en el UT, es posible realizar la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los efectos proliferativos, desinflamatorios y en la diferenciación miogénica que provoca el ultrasonido terapéutico en un cultivo de células troncales de pulpa dental humana (hDPSC) y un co-cultivo con células de músculo de ratón (C2C12)?

## 5. Justificación

Los cultivos celulares tienen ventajas como el control del entorno y simulación de condiciones ambientales específicas y a su vez resultados más predecibles, otra ventaja de este tipo de estudios implica el aspecto ético dado que evita la experimentación en animales que involucra aspectos legales, morales y éticos. (35–37)

Estudios *in vitro*, aunque no son apropiados para identificar efectos biológicos generales, son de gran interés para estudiar mecanismos de acción específicos, por lo tanto, un desafío de la ingeniería del futuro es el diseño de experimentos donde se puedan controlar los diferentes fenómenos mecánicos inducidos por el UT, sin embargo, los mecanismos por los cuales el ultrasonido puede interactuar con las células o sus microambientes todavía están desarrollándose y abiertos a debate. (101)

Los actuales efectos no térmicos que han sido incorporados a las aplicaciones terapéuticas como son la corriente acústica, la micro-corriente y la cavitación celular, han tenido un gran auge en la ultrasonoterapia moderna, debido a los cambios que producen en la permeabilidad de la célula y su actividad metabólica. (102) El LIPUS se relaciona con aumento del calcio intracelular, mismo que puede alterar la actividad enzimática celular y así estimular la síntesis y secreción de proteínas siendo los iones de calcio que actúan como segundos mensajeros sobre las células, (103) existe evidencia que indica que los mecanismos "no térmicos" juegan un papel principal en producir un efecto terapéuticamente significativo (83) al provocar la respuesta celular de los macrófagos y la permeabilidad de la membrana, se puede explicar porque el UT es utilizado clínicamente en la fase inflamatoria de la cicatrización. (104)

Un estudio realizado logró obtener 300 % más en la proliferación celular de un linaje osteoblastoide MC3T3-E1 (105) utilizando UT pulsado además de obtener otros beneficios sobre el cultivo celular como aumento del calcio intracelular, disminución del calcio y magnesio en el sobrenadante, activación del complejo NF  $\kappa$ B1 y mTOR a través de p38 $\alpha$  y una disminución en la síntesis de TGF- $\beta$ 1, que es un inhibidor del crecimiento celular.

Sordo-Carrillo.

Por otro lado artículos de revisión han demostrado algunas carencias en la dosimetría a utilizar en la aplicación de UT a utilizar, lo que hace necesitar más estudios para la comprobación de estos parámetros en su aplicación clínica. (27,33,81,82)

El desarrollo de esta investigación proporcionará aporte científico y datos de agentes físicos en fisioterapia basado en evidencia para la utilización en la práctica clínica.

La investigación planteada contribuye a generar mayor conocimiento acerca de los parámetros que se deben utilizar para beneficiar o perjudicar la viabilidad celular *in vitro*, comparar los resultados obtenidos con los trabajos de otros autores y posteriormente integrar el conocimiento obtenido al ámbito clínico, y así brindar una mejor atención a los pacientes contribuyendo en la generación de nuevo conocimiento realizado en la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad León, siendo de igual manera, un precedente de investigación en ciencia básica, con el fin de observar los efectos que provoca el uso del UT en la desinflamación y proliferación celular en hDPSC así como su potencial uso para la diferenciación a linaje celular miogénico.

## 6. Hipótesis

### 6.1 Hipótesis de investigación

El efecto del ultrasonido terapéutico muestra resultados benéficos en la proliferación, desinflamación y su potencial diferenciación miogénica de células troncales de pulpa dental humana.

### 6.2 Hipótesis nula

El efecto del ultrasonido terapéutico no muestra resultados benéficos en la proliferación, desinflamación y sin mostrar diferenciación miogénica de células troncales de pulpa dental humana.

## 7. Objetivo

Demostrar el efecto del ultrasonido terapéutico (UT) *in vitro* en la proliferación, desinflamación y potencial diferenciación miogénica con cultivo de células troncales de pulpa dental humana (hDPSC) y co-cultivo con células de músculo esquelético de ratón (C2C12).

### 7.1 Objetivos específicos

- Obtener, aislar, establecer, proliferar y caracterizar hDPSC con base a los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular.
- Cuantificar la proliferación celular de hDPSC expuestas a UT con diferentes parámetros mediante el ensayo de MTT.
- Identificar la dosificación de UT para la mayor proliferación de hDPSC.
- Determinar la cuantificación de PGE<sub>2</sub> en hDPSC expuestas a la dosificación de UT que mostró mayor proliferación celular mediante un ensayo de ELISA.
- Comparar la diferenciación miogénica de un co-cultivo de hDPSC-C2C12 con y sin tratamiento de UT mediante la caracterización microscópica e inmunocitoquímica.

## 8. Marco Metodológico

### Tipo de estudio

Experimental puro.

### Diseño de estudio

Prospectivo, descriptivo.

### Universo

Células eucariotas humanas y de ratón.

### Muestra

Células troncales de pulpa dental humana (hDPSC) y células de músculo esquelético (C2C12) de ratón por cuotas  $1 \times 10^6$  células/mL.

### Tamaño de muestra

Se trata de un muestreo no probabilístico por cuotas; n=9 por grupos para obtener reproducibilidad en el método

### Criterios de selección

Inclusión:

- Terceros molares libres de caries, alguna patología periapical o infección.
- Terceros molares de pacientes entre 18 y 30 años sin toxicomanías.
- Células con características de hDPSC.
- Línea celular de linaje C2C12.
- Células viables para aplicar un tratamiento con UT.
- Células libres de contaminación a la observación en el microscopio.
- Cultivos con adecuada densidad celular.

Exclusión:

- Células que presenten contaminación.



Sordo-Carrillo.

- Células no viables para aplicar UT.
- Muestras que no cumplan con los criterios de inclusión.

Eliminación:

- Muestras sin la adecuada cantidad de células ( $1 \times 10^6$  células/mL).
- Muestras contaminadas o con errores en la inoculación.

## 9. Variables

### 9.1 Variables dependientes

<b>Variable</b>	<b>Definición Conceptual</b>	<b>Definición Operacional</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Escala y unidad de medición</b>
<b>Proliferación celular</b>	Proceso mediante el cual las células se dividen en dos mediante la mitosis celular. (106)	Número de hDPSC viables posterior a la aplicación de UT e incubación de 48 horas obtenida por el ensayo MTT y analizadas a 570 nm.	Cuantitativa Continua	Razones de 0 a n absorbancia (células viables).
<b>Desinflamación</b>	Reacción de defensa que se manifiesta ante cualquier tipo de lesión en los tejidos. (80)	Expresión de PGE <sub>2</sub> de hDPSC en el sobrenadante del medio de cultivo posterior a ser tratadas con UT con el objetivo de identificar la inflamación.	Cualitativa	Razones de 0 a n absorbancia (Expresión de PGE <sub>2</sub> ).
<b>Diferenciación celular</b>	Cambios en las propiedades físicas y funcionales de las células a medida que van proliferando. (106)	Las hDPSC fueron inducidas a diferenciación celular miogénica en co-cultivo con C2C12 con y sin UT.	Cualitativa	Características morfológicas positivas a linaje miogénico e inmunocitoquímica.

## 9.2 Variables independientes

Variable	Definición	Definición Operacional	Tipo	Escala y unidad de medición
<b>Intensidad de UT</b>	Magnitud de energía acústica por unidad de tiempo expresada en Watts. (12)	Se aplicó UT en cultivos celulares correspondientes con intensidades de 0.5 y 1 W/cm <sup>2</sup>	Cualitativa	Nominal →0.5 MHz →1 MHz
<b>Tiempo de aplicación</b>	Cantidad específica de segundos, minutos u horas en que se aplica el UT. (107)	El UT se aplicó por periodos de 5 y 10 minutos a los grupos correspondientes.	Cualitativa	Nominal →5 minutos →10 minutos
<b>Ciclo de trabajo</b>	Cantidad fraccional de tiempo que se activa el pulso de trabajo. (21) <u>Continuo:</u> Liberación continua de ultrasonido a lo largo del periodo de tratamiento. (12) <u>Pulsado:</u> Liberación intermitente de ultrasonido (pulsos de encendido y	Se utilizó UT con un ciclo de trabajo pulsado al 20 % y continuo al 100 % a los cultivos celulares correspondientes.	Cualitativa	Nominal 1. Continuo (100 %) 2. Pulsado (20 %)

Efectos del ultrasonido terapéutico en cultivo con hDPSC

---

Sordo-Carrillo.

	apagado a lo largo del periodo de tratamiento. (12)			
--	---	--	--	--

## 10 Materiales y Métodos

### 10.1 Implicaciones éticas

La obtención de las muestras se llevó a cabo en la clínica de cirugía oral de la ENES Unidad León con la previa autorización del paciente y firma del consentimiento informado para su extracción. Se explicó de manera clara, breve y concisa los propósitos de la investigación.

Con lo que respecta a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos y de acuerdo a los principios de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y de acuerdo al reglamento de la ley general de salud en materia de investigación, se contará con el consentimiento informado de los pacientes para la donación de sus órganos dentarios.

De acuerdo a la ley general de salud y al artículo 15, prevalecerá el criterio de respeto a su dignidad y la protección de sus derechos, así como el bienestar de los pacientes que aceptaron donar sus órganos dentarios. El artículo 16 se refiere a la investigación en seres humanos, se protegerá la privacidad del individuo sujeto a investigación, identificándolo sólo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

Considerando que esta investigación se encuentra en el esquema de Título segundo, capítulo 1, artículo 17, inciso II: Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el riesgo de datos a través de procedimientos comunes en exámenes, dientes deciduos y dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica, prótesis dental y cuyos datos serán vertidos en los formatos específicos. Por tratarse de una investigación con riesgo mínimo y de acuerdo al artículo 23 del Capítulo II, donde menciona que en el caso de investigaciones con riesgo mínimo, la comisión ética, por razones justificadas, podrá autorizar que el consentimiento informado se obtenga sin formularse por escrito y tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador la obtención del consentimiento informado.

## 10.2 Materiales

Para la realización de este proyecto y mantener la viabilidad de los cultivos celulares fue necesario mantener un estricto control de los materiales utilizados, equipos e insumos a utilizar entre los cuales se contemplaron: Campana de flujo laminar horizontal (Biobase,China) (Fig. 6A), Microscopio (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania) (Fig. 6B), Centrifugadora (Beckman®, J2-MC, Indianapólis, EUA), Incubadora (Binder®, Tuttlingen, Alemania) (Fig. 6C), Espectrofotómetro (Thermo Sientific®, Finlandia) (Fig. 6D), Ultrasonido Terapéutico (Intelect Anvanced Combo Chattanooga, California, EUA) (Fig. 6E) y Microscópio estereoscópico de fluorescencia (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania) (Fig. 6F).



Fig. 6: Equipos utilizados en la realización del proyecto: A) Campana de flujo laminar horizontal, B) Microscopio, C) Incubadora, D) Espectrofotómetro, E) Ultrasonido Terapéutico, F) Microscopio estereoscópico de fluorescencia. Fuente directa.

### 10.3 Instrumental

Micropipetas (Thermo Scientific®, Rochester, NY, EUA), frascos de cultivo Falcon® (Becton, Dickinson Labware, NJ, EUA), cajas Petri (Thermo Scientific Rochester, NY, EUA).

### 10.4 Insumos

Buffer de fosfato (PBS) pH 7.4, suero fetal bovino (SFB) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA) al 10 % y 20 %, Tripsina al 0,05 % (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), Penicilina/estreptomicina 10,000 UI/mL y 10,000 µg/mL (Penstrep) (Gibco® by Life Technologies corporation, Gran Island, NY, EUA), dimetilsulfóxido (DMSO) (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EUA), interlucina (IL-1β, 3B, 3 ng/mL), gel conductor de transmisión de Ultrasonido (Chattanooga, California, EUA.), Alician blue 8GX (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany).

### 10.5 Obtención, aislamiento, establecimiento, proliferación y caracterización de hDPSC

Se obtuvieron terceros molares mediante odontectomía de pacientes de entre 18 a 30 años de la clínica de cirugía oral de la ENES Unidad León que fueron almacenados y transportados en PBS con pH de 7.4 adicionada con el 1 % de antibiótico Penstrep y 1 % de glutamina. Se lavó el diente tres veces con PBS removiendo los restos de tejido hematopoyético, se hizo una sección a nivel de la línea cervical sin alcanzar la cámara pulpar seguido de la separación de la corona y la raíz para obtener el tejido pulpar, fue extraído cuidadosamente para colocar el tejido sobre un porta objetos de vidrio y realizar explantes de 1x1 mm aproximadamente, se realizó el aislamiento de hDPSC y se inoculó en medio α-MEM suplementado en platos de cultivo de 10cm, posteriormente su cultivo y proliferación durante 7 días, manteniéndolas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad en la



Sordo-Carrillo.

incubadora celular cambiando el medio de cultivo dos veces por semana, se valoró el crecimiento celular que fue utilizado como cultivo primario. Los subcultivos se realizaron cuando se observó una confluencia del 90 %. Las células fueron desprendidas con Tripsina, se observó bajo el microscopio el desperdimiento y se agregaron 3 mL de medio de cultivo fresco para inactivar la tripsina seguido de un conteo celular con hematocitómetro, finalmente se inoculó 1 mL en razones de  $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  células/mL en función de los platos de cultivo a subcultivar, se añadieron de 6 a 10 mL de medio de cultivo y se colocaron en la incubadora bajo las mismas condiciones.

Para la diferenciación a linajes celulares se realizaron subcultivos de hDPSC en DMEM + 10 % SFB + Penstrep + l-glutamina a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/mL en platos de cultivo e incubadas a 37 °C con 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad hasta observar una confluencia celular del 80 % - 100 %, se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con PBS. Se realizaron los siguientes procedimientos para la diferenciación a cada uno de los linajes:

1. Linaje osteogénico:

Se agregó medio de diferenciación osteogénico ( $\alpha$ -MEM [SFB 10 %, Penstrep (1 %), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL)]. El medio de cultivo fue reemplazado cada segundo día durante 4 semanas, la diferenciación fue interrumpida con una tinción de rojo Alizarina (40 mM) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.1 M) y un pH de 4.3 seguido de lavado con PBS dos veces. Se fijaron las células con etanol al 70 % v/v por 30 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 0.25 mL de rojo de Alizarina por 10 minutos a temperatura ambiente, finalmente los lavados se hicieron dos veces con PBS y cinco veces con agua bidestilada para la observación de las estructuras mineralizadas bajo el microscopio.

2. Linaje adipogénico:

Se agregó medio de diferenciación adipogénica ( $\alpha$ -MEM [SFB 10 %, Penstrep (1 %), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL)] adicionado con insulina y L-glutamina reemplazando el medio cada segundo día durante 4 semanas, se lavó dos veces con PBS seguido de la colocación de medio de cultivo con una solución saturada de rojo

aceitoso (0.3 g) en isopropanol 60 % v/v (100 mL) por 1 hora a temperatura ambiente, nuevamente se realizó el lavado con PBS dos veces para finalmente observar bajo el microscopio la presencia de depósitos de lípidos de color rojo/naranja.

### 3. Linaje condrogénico:

Se subcultivaron las células en platos de cultivo de 6 pocillos en forma de microgota con medio de diferenciación ( $\alpha$ -MEM [SFB 10 %, Penstrep (1 %), dexametasona (0,1 mM), B-Glicerofosfato (10 mM), ascorbato-2 fosfato (50 mg/mL), proteína morfogenética ósea (BMP-1 o 4)] reemplazando el medio cada segundo día durante 2 semanas, posteriormente se lavaron dos veces con PBS y fijadas con etanol al 70 % v/v por 10 minutos, se lavaron nuevamente con PBS y se agregó 0.15 mL de safranina O (0.1 %) por 5 minutos a temperatura ambiente. Los lavados se hicieron cinco veces con 0.15 mL de etanol al 100 % y cinco veces con agua bidestilada. Se realizó la observación bajo el microscopio y la identificación de glucosaminoglicanos de apariencia azul en el microsomia cultivado.

La Figura 7 resume metodología comúnmente utilizada para la obtención hDPSC con los marcadores de la ISCT y las pruebas a las que fueron sometidas para su caracterización.

Sordo-Carrillo.

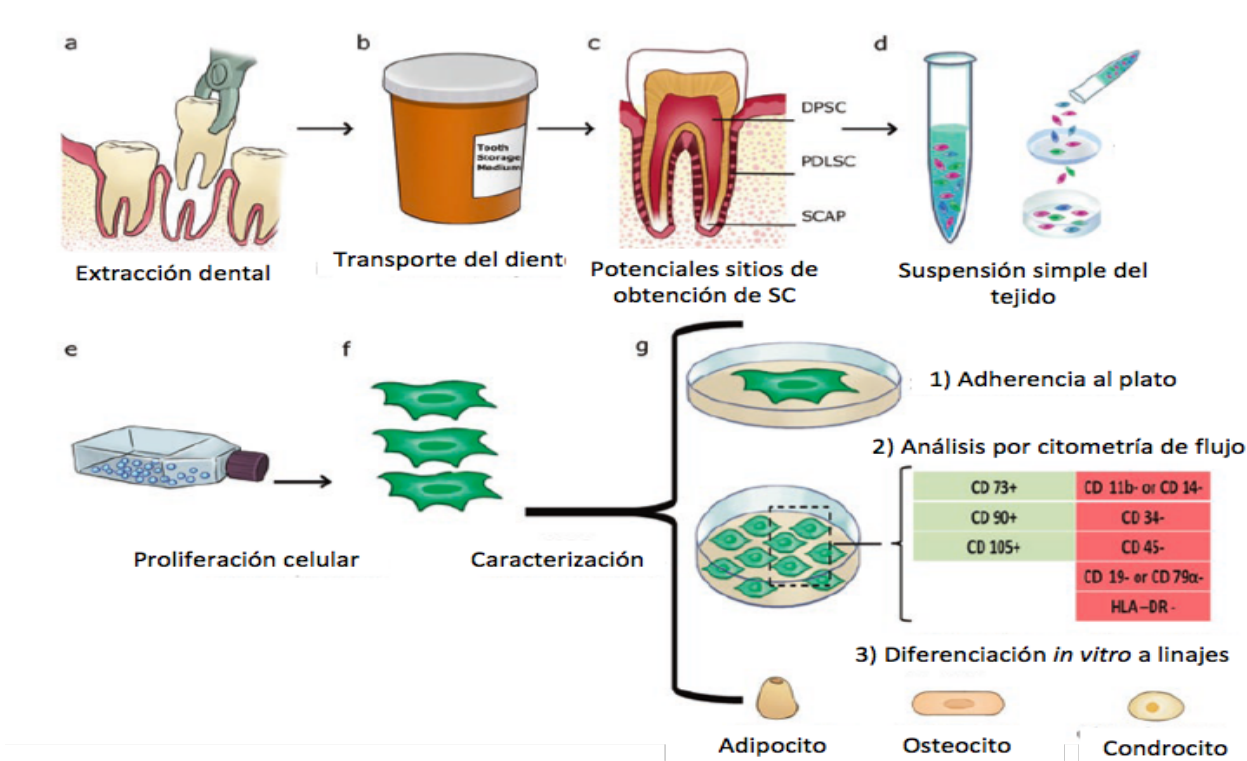


Fig. 7: Metodología que comúnmente se realiza para la obtención, aislamiento, establecimiento, proliferación y caracterización de hDPSC. Fuente: Bakkar *et. al.* Adult Stem Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 2017.

## 10.6 Ensayo de viabilidad celular y tratamiento con UT

Las hDPSC fueron subcultivadas en la cuarta división celular a  $1 \times 10^6$  células/mL durante 48 horas hasta lograr una adecuada confluencia celular en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB, 1 % de antibiótico y 1 % de glutamina e incubado a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. El formato del plato de cultivo celular fue en platos de cultivo de 6 pocillos. Se aplicó UT en 9 diferentes grupos de hDPSC (Tabla 5). La frecuencia del UT fue establecida a 1 MHz en todos los grupos a los que se les aplicó tratamiento, el ciclo de trabajo, intensidad y duración se explican en la siguiente tabla:

<b>Grupo</b>	<b>Ciclo de trabajo (%)</b>	<b>Intensidad (W/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Duración de tratamiento (min)</b>
<i>Grupo 1:</i>	100	0.5	5
<i>Grupo 2:</i>	100	0.5	10
<i>Grupo 3:</i>	100	1.0	5
<i>Grupo 4:</i>	100	1.0	10
<i>Grupo 5:</i>	20	0.5	5
<i>Grupo 6:</i>	20	0.5	10
<i>Grupo 7:</i>	20	1.0	5
<i>Grupo 8:</i>	20	1.0	10
<i>Grupo 9:</i>	Sin tratamiento		

Tabla 5: parámetros de UT utilizados en cada grupo al que se le aplicó tratamiento.

El ultrasonido se aplicó con técnica directa, estacionaria, colocando el cabezal aproximadamente a 2 mm por debajo del fondo del plato de cultivo utilizando gel conductor de transmisión de ultrasonido entre el cabezal y el plato de cultivo para la transmisión de la onda durante el tiempo establecido. El diámetro del transductor de ultrasonido fue de 35 mm, la misma medida que el pocillo donde se aplicó UT una sola vez por pocillo (Fig. 8).



Fig. 8: Aplicación de UT a los cultivos celulares.

Fuente directa.

La atenuación de la onda no se tomó en cuenta, ya que los efectos fueron los mismos en todos los platos de cultivo y en todos los parámetros utilizados, suponemos que las reflexiones del campo del ultrasonido fueron idénticas dentro y fuera del medio, ya que todos los platos de cultivo fueron preparados de la misma manera con respecto a la cantidad del medio de cultivo.

La aplicación del UT se realizó siempre manteniendo un ambiente lo más estéril posible para evitar la contaminación de las muestras, para esto fue necesario realizar la aplicación en una campana de flujo laminar horizontal, utilizando material estéril. Posteriormente, se dejaron incubar durante 24 horas más a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. La viabilidad celular fue determinada con el ensayo de MTT (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (0.2 mg/mL) disuelto en medio de cultivo suplementado y fueron incubadas durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. El formazán fue disuelto con DMSO y analizado en un espectrofotómetro de microplaca a 570 nm con el programa XFluor basado en Microsoft Excel®.

10.7 Efecto desinflamatorio de UT en cultivo de hDPSC

Las hDPSC fueron subcultivadas como se mencionó anteriormente. Una vez obtenida la proliferación celular, las hDPSC fueron inducidas a un estado proinflamatorio con IL-1 $\beta$ , 3ng/mL, durante 3 horas. La dosificación aplicada con el UT fue la correspondientes al grupo 8 (20 % de ciclo de trabajo, 1.0 W/cm<sup>2</sup> de intensidad, 10 minutos de tratamiento). La expresión de la PGE<sub>2</sub> fue determinada siguiendo las instrucciones del fabricante del protocolo señalado mediante un ensayo de ELISA (R & D systems, Minnesota, EUA).

La Tabla 6 muestra los grupos de estudio para este ensayo: (Fig. 9)

Grupo	Características
UT (+)	Con IL-1 $\beta$ con UT
UT (-)	Sin IL-1 $\beta$ con UT
(-)	Sin IL-1 $\beta$ sinUT
(+)	Con IL-1 $\beta$ sin UT

Tabla 6: Grupos utilizados para evaluar el efecto desinflamatorio del UT

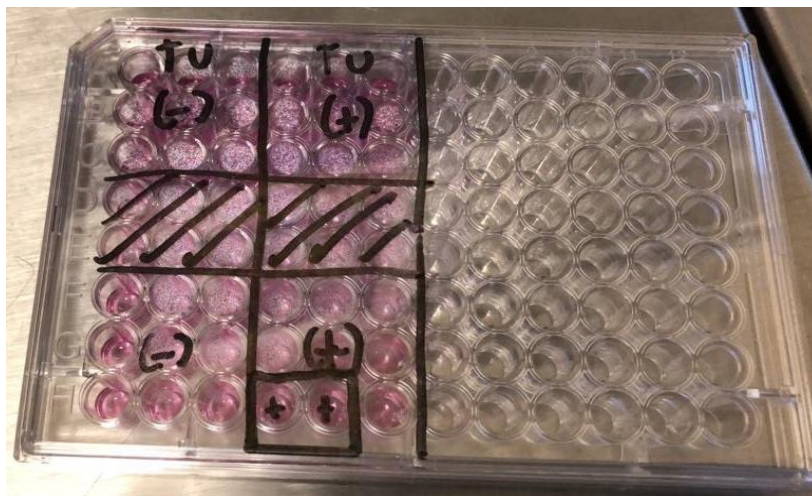


Fig. 9: Grupos de aplicación de UT en hDPSC para expresión de PGE<sub>2</sub>. Fuente directa.

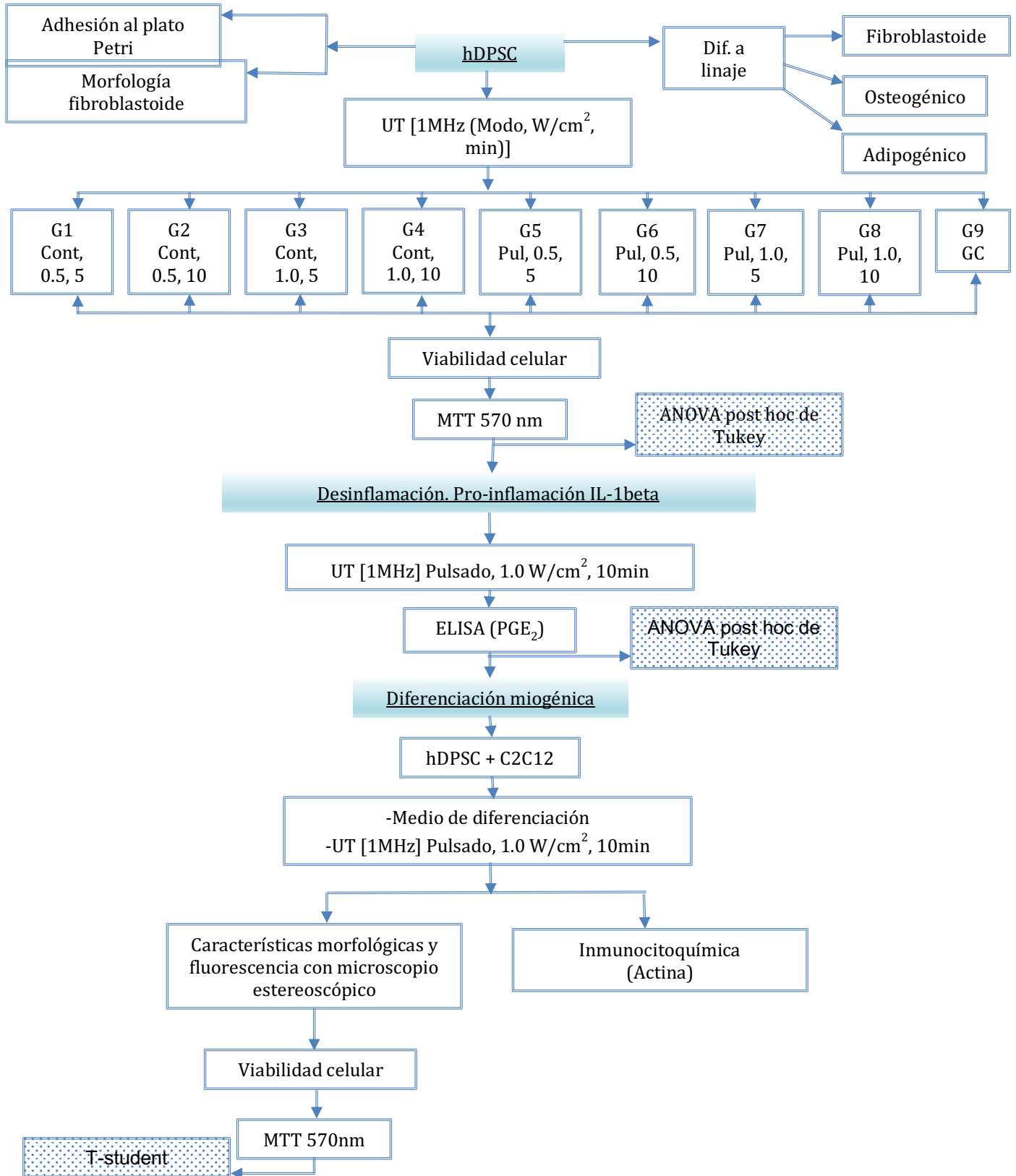
### 10.8 Diferenciación miogénica (co-cultivo)

Se realizó un co-cultivo  $1 \times 10^6$  células/mL de hDPSC (División celular 5) con una línea celular C2C12 (ATCC® CRL-1772) células de músculo esquelético de ratón, colocadas en un plato de cultivo de 6 pocillos manteniéndolas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad en la incubadora celular hasta lograr una confluencia del 80 %. Una vez lograda la confluencia celular el medio de cultivo fue cambiado por medio de diferenciación (DMEM con alta concentración de glucosa, 2 % de SFB, 1 % de glutamina, 1 % de penstrep y 1 % L-ácido ascórbico) adicionado. El tratamiento de UT correspondiente al grupo 8 fue utilizado a las 0 hrs, 72 hrs, 144 hrs y 192 hrs hasta contemplar 8 días de diferenciación. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día. La caracterización de las células fue observada bajo el microscopio de contraste de fase y en estereomicroscopía con fluorescencia. Las células fueron teñidas previamente con Alician blue 8GX y caracterizada la morfología celular. La caracterización inmunocitoquímica se realizó con la aplicación de anticuerpos para la presencia de actina en células del co-cultivo a los 9 días de tratamiento y utilizando una técnica de inmunexpresión para células musculares. El índice de fusión se calculó como la relación entre el número de núcleos dentro de los miotubos MyHC + y el número de viabilidad por ensayo de MTT (porcentaje).

### 10.9 Análisis estadístico

El promedio, desviación estándar y porcentaje fueron determinados a partir de los datos obtenidos. Los datos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y pruebas de ANOVA Post Hoc de Tukey para el ensayo de viabilidad celular (n=27) y para el ensayo del efecto desinflamatorio (n=9). Los datos obtenidos durante el ensayo de diferenciación miogénica fueron analizados mediante la prueba T-student. La significancia estadística fue fijada con un valor  $p < 0.05$  y un coeficiente de confiabilidad del 95 %.

El diagrama de la metodología utilizada en este estudio se resume en el siguiente cuadro:





## 11 Resultados

### 11.1 Obtención, aislamiento, establecimiento, proliferación y caracterización de hDPSC

Después de 21 días de incubación y proliferación a partir del explantes (Fig. 10), las hDPSC mostraron: 1) Adherencia al plato de cultivo (Fig. 10A); 2) Morfología fibroblastoide (Fig. 10B); 3) Diferenciación a linaje osteogénico (Fig. 10C); 4) Diferenciación a linaje adipogénico (Fig. 10D), 4) Diferenciación a linaje condrogénico (Fig. 10E).

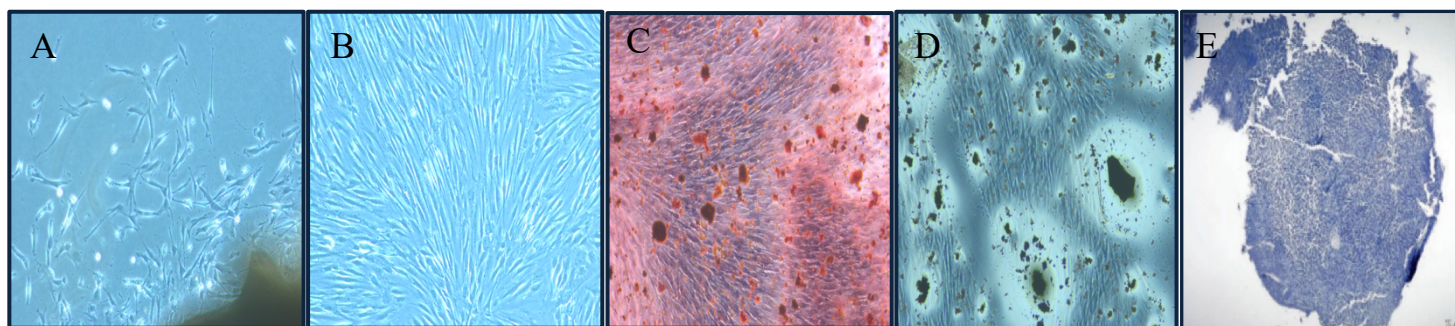


Fig. 10: A) Proliferación y adherencia al plato de cultivo, B) Morfología fibroblastoide, C) Diferenciación osteogénica, D) Diferenciación adipogénica, E) Diferenciación condrogénica.

Fuente directa.

La caracterización de las hDPSC puede ser observada en la Tabla 7:

Adhesión al plato de cultivo	+++++
Morfología fibroblastoide	+++++
Linaje Adipogénico	++++
Linaje Osteogénico	+++++
Linaje Condrogénico	+++

Tabla 7: Caracterización de hDPSC.

## 11.2 Ensayo de viabilidad celular y tratamiento con UT

La Tabla 8 muestra el porcentaje y desviación estándar de la viabilidad celular de las hDPSC expuestas a diferentes parámetros de UT.

<b>Grupo</b>	<b>Promedio de viabilidad (%)</b>
<i>Control</i>	100±14
1	88±26
2	97±29
3	23±8
4	121±25
5	139±33
6	118±32
7	127±20
8	141±21**

Tabla 8: Proliferación celular\*\* p<0.01, ANOVA Post Hoc de Tukey Test.

A continuación se muestran las imágenes representativas de las hDPSC inmediatamente después de aplicar el UT, a las 72 horas y el ensayo MTT en los grupos tratados. (Fig. 11)

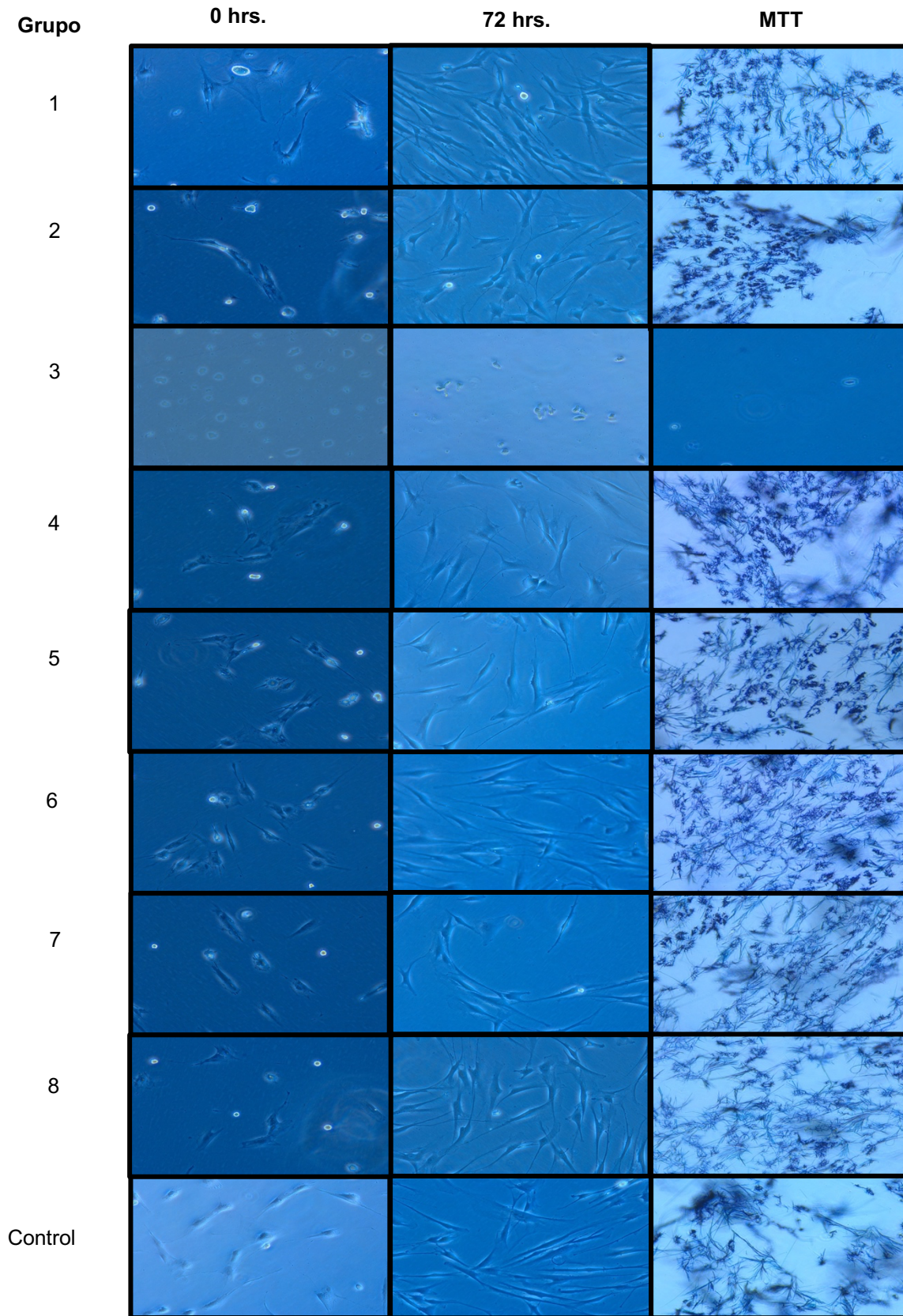
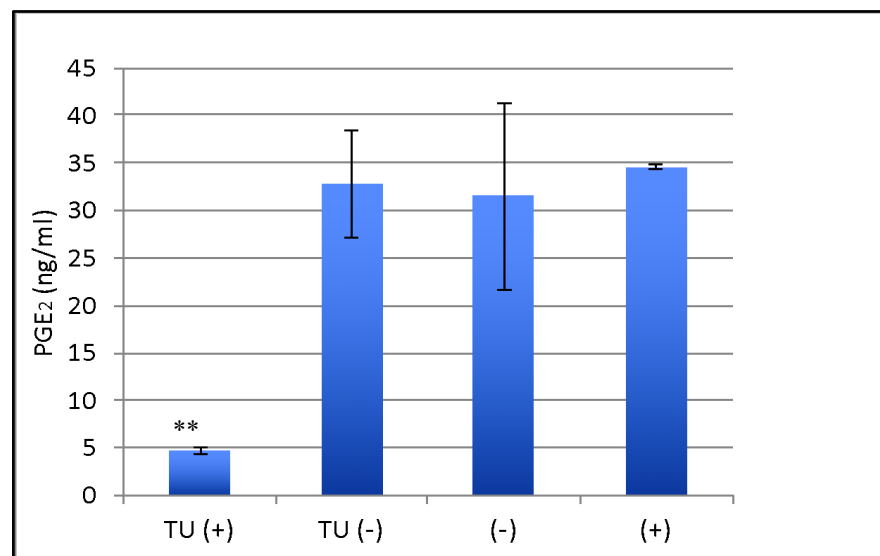


Fig. 11: Grupos de estudio de hDPSC post UT y MTT respectivamente. Fuente directa.

### 11.3 Efecto desinflamatorio de UT en cultivo de hDPSC

La siguiente gráfica muestra la expresión de PGE<sub>2</sub> posterior al tratamiento de UT, las hDPSC fueron inducidas a un estado proinflamatorio con IL-1 $\beta$  y tratadas con UT (Gráfica 1). Se puede observar que el grupo inducido a estado proinflamatorio y tratado con UT (TU +) tiene una expresión de PGE<sub>2</sub> menor a los grupos control explicados en la metodología. Lo que evidencia la acción desinflamatoria del UT.

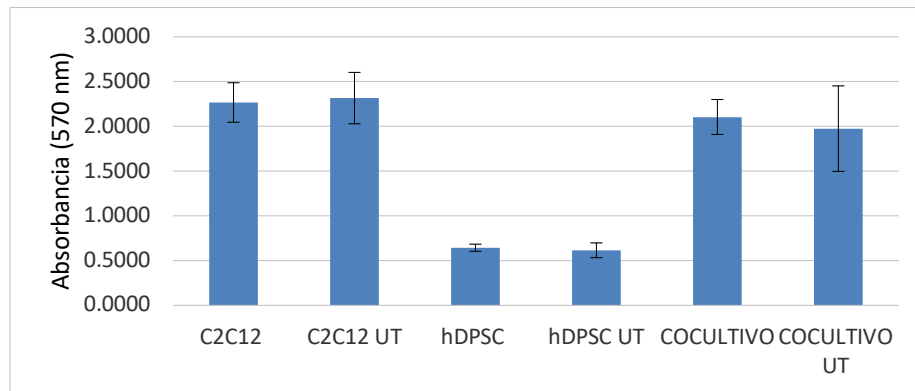


Gráfica 1: Expresión de PGE<sub>2</sub> en hDPSC, (+/-) IL-1 $\beta$ . \*\*p<0.01, ANOVA Post Hoc de Tukey Test. Fuente directa.

### 11.4 Diferenciación miogénica

El análisis de viabilidad celular no mostró diferencias significativas entre los grupos tratados con UT y los no tratados al realizar el ensayo de MTT (Gráfica 2) muestra la diferencia entre la proliferación celular acelerada de C2C12 independientemente de el tratamiento de UT comparadas con hDPSC.

Sordo-Carrillo.



Gráfica 2: Viabilidad celular a en grupos utilizados para la diferenciación miogénica. T-student  $p > 0.05$ . Fuente directa.

Las hDPSC co-cultivadas con células C2C12 durante 8 días (192 hrs) y tratadas con UT, revelaron mejor morfología de células multinucleadas positivas para la actina de cadena pesada y una mejor calidad de los miotubos en comparación del co-cultivo sin UT en los días 3 y 6 de inducción miogénica en la esteromicroscopía (Fig. 12).



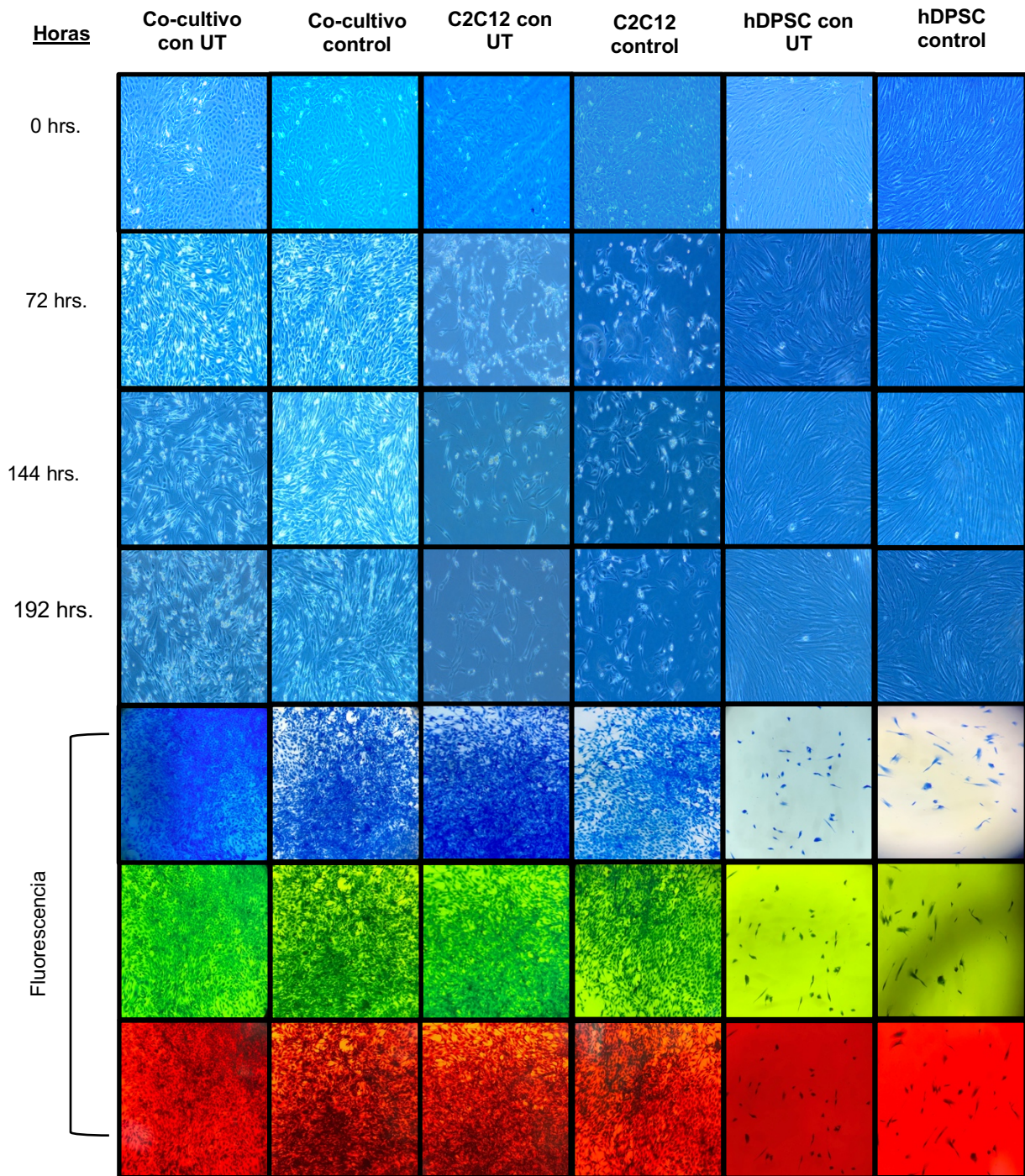


Fig. 12: Proliferación y diferenciación miogénica de co-cultivos celulares a los 0, 3, 6 y 8 días de tratamiento. Fuente directa.

Al día 9 los análisis de inmunocitoquímica mostraron mayor cantidad de marcadores positivos a miotubos multinucleados de actina de cadena pesada que contenían núcleos en el co-cultivo tratado con UT en comparación con el no tratado, en la parte superior los co-cultivos control y en la parte inferior los co-cultivos tratados con UT a 10x y 40x respectivamente, observándose en color café las células positivas (Fig. 13) mostrando de igual manera mayor homogeneidad celular en el co-cultivo tratado con UT. En cuanto a los cultivos con hDPSC no mostraron marcadores positivos así como los cultivos C2C12 mostraron ambos marcadores positivos como se tenía previsto.

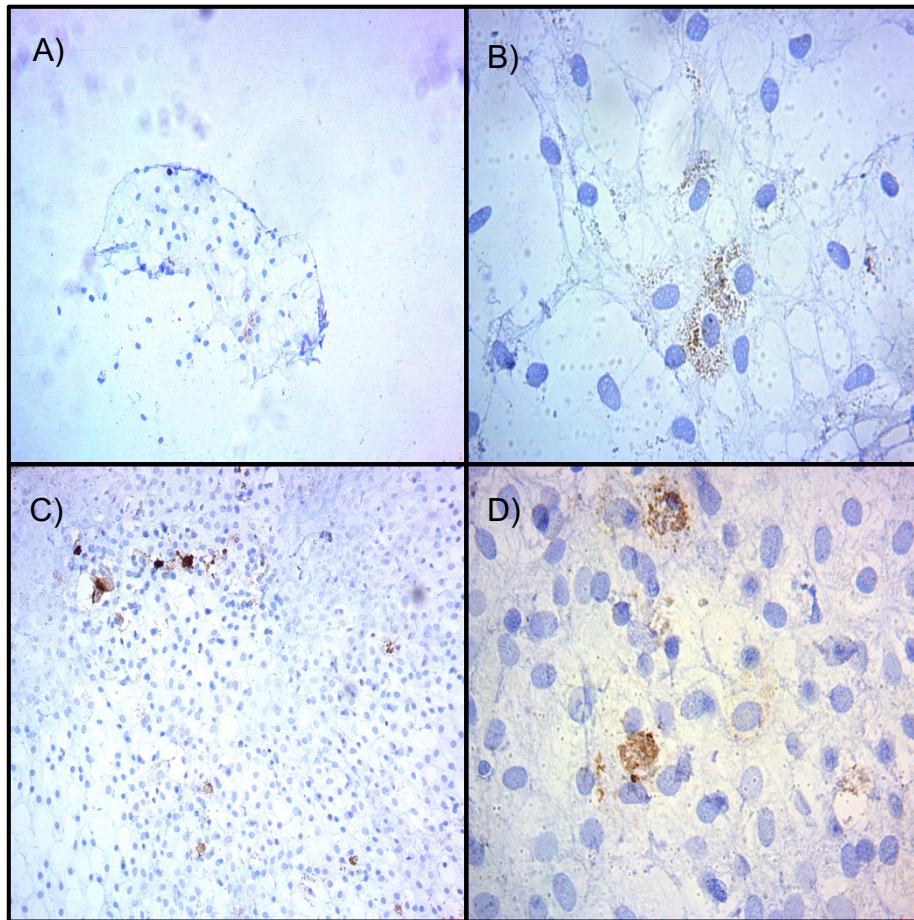


Fig. 13: A) co-cultivo control 10x, B) co-cultivo control 40x, C) co-cultivo con UT 10x, D) co-cultivo con UT 40x. Fuente directa.



## 12 Discusión

### 12.1 Obtención, aislamiento, establecimiento, proliferación y caracterización de hDPSC

En este estudio, se aislaron varias poblaciones de hDPSC como se ha reportado anteriormente. (108) Las hDPSC mantuvieron una morfología típica a paso de 15 divisiones celulares. Las características fibroblastoides de células pequeñas con núcleos grandes en relación con el volumen del citoplasma, adherencia al plato de cultivo, diferenciación a linajes y marcadores positivos y negativos según la ISCT. (109) Los resultados de la caracterización de las hDPSC coinciden con los reportados previamente y da lugar a que nuevas investigaciones sean realizadas con una población estable de hDPSC así como la aplicación de tratamientos no invasivos sobre los cultivos celulares. Sin embargo, una preocupación principal para la aplicación clínica potencial basada en la terapia con células madre es la estabilidad genética. (110, 111)

### 12.2 Ensayo de viabilidad y tratamiento con UT

Stewart J. en 2006 (30) utilizó el efecto del LIPUS para la reparación de fracturas en un modelo animal obteniendo efectos no significativos 25 días posteriores a la fractura, Kang KS. *et al* en 2011 (112) no encontraron diferencias significativas en la proliferación celular pre-osteoblástica en un estudio donde se aplicó tratamiento de UT, tensión cíclica y terapia combinada a los diferentes grupos, concluyen que la estimulación mecánica no afecta la proliferación celular en pre-osteoblastos, Artilheiro P. en 2010 (98) utilizando UT en intensidades de 0.2 W/cm<sup>2</sup> y 0.5 W/cm<sup>2</sup>, frecuencias de 1 MHz y 3 MHz durante 2 y 5 minutos sobre células C2C12 en modo continuo, concluyó que estos parámetros no son capaces de alterar la proliferación celular. Los resultados obtenidos en este estudio acerca del uso de UT a las hDPSC muestra resultados similares donde algunos parámetros utilizados no afectan significativamente la proliferación celular principalmente donde se utiliza la onda continua. Por otro lado Murillo F. en 2016 (113) aplicó LIPUS en



Sordo-Carrillo.

osteoclastos dentales donde obtuvo resultados benéficos en cuanto a la actividad de resorción en ausencia de osteoblastos, Tassinary MD. en 2015 (105) demostró que el UT utilizado en un linaje celular MC3T3-E1 de células pre-osteoblásticas con un ciclo de trabajo al 20 % podía favorecer la proliferación hasta en un 300 %, aunque ambos sugieren más investigación con diferentes protocolos de aplicación de UT, estos estudios concuerdan con los resultados de esta investigación ya que la estimulación mecánica como el la dosificación del grupo 8 favorecen la proliferación celular, es decir, en aquellos donde el ciclo de trabajo fue pulsado.

### 12.3 Efecto desinflamatorio de UT en cultivo de hDPSC

Cohen G. en 2015 (114) encontró que el UT aplicado en modo pulsado y a baja intensidad junto con fármacos tópicos (betametazona) mejoraba significativamente la inflamación en comparación con la aplicación de fármacos o UT de manera independiente en un modelo de ratón con artritis reumatoide, así como Casimiro L. *et al.* en 2002 encontraron en un revisión bibliográfica que el uso de UT aislado, reducía el número de articulaciones inflamadas en pacientes con artritis reumatoide. (115) Es evidente que en este estudio, los parámetros de UT pulsado mostraron resultados significativos en la disminución de la expresión de PGE<sub>2</sub> demostrando así su potencial efecto desinflamatorio en un modelo *in vitro* de cultivo celular y con potencial aplicación en procesos inflamatorios agudos y con evidencia que también puede hacerlo en procesos crónicos durante investigaciones clínicas.

### 12.4 Diferenciación miogénica

Abrunhosa VM. en 2014 (93) y colaboradores han proporcionado evidencia indicando que el UT intensifica la diferenciación de células músculo esqueléticas, Tassinary JAF. *et al.* en 2015 (105) concluyeron en un estudio *in vitro* que el UT a baja intensidad en células pre-osteoblásticas MC3T3-E1 induce a la proliferación, aunque no lograron demostrar diferenciación celular de las mismas.

Karp G. en 2011 (116) en su texto “Posibilidad de un tratamiento con reemplazo celular” enfoca una perspectiva sobre la posibilidad de la regeneración de tejidos mediante cultivos *in vitro* para su posterior aplicación en la práctica clínica por lo tanto, la capacidad de hDPSC para someterse a diferenciación SMC podría estar relacionado con su potencial de diferenciación neuroectodérmica y es extremadamente importante para aplicaciones *in vivo* donde se necesitan nuevos vasos sanguíneos funcionales. En este estudio, también proporcionamos evidencia de que las hDPSC de diferentes donantes son capaces de fusionarse con células C2C12 de ratón después de 8 días de inducción miogénica, generando así miotubos híbridos. La capacidad de fusionar se mantuvo durante al menos diez pasajes celulares.

Al igual que nuestros resultados, un estudio reciente con DPSC demostró que son capaces de fusionarse con células C2C12 que forman miotubos híbridos, aunque la inducción miogénica fue prolongada a 14 días. (117)

La hipótesis establecida en el estudio, tomando en conjunto y por consenso de los resultados previamente mostrados, se acepta, ya que se mostró evidencia sobre el uso benéfico del UT para la proliferación, desinflamación en cultivo de hDPSC así como características y marcadores positivos en co-cultivo para la diferenciación a linaje miogénico.

### 13 Conclusión

En este estudio se logró demostrar el efecto del ultrasonido terapéutico *in vitro* en la proliferación, desinflamación y un potencial uso para lograr una mejores características celulares durante la diferenciación miogénica con cultivo de hDPSC y co-cultivo con células C2C12. Estos resultados ayudan a la realización de futuras investigaciones ya que:

- Se tuvo éxito en el aislamiento de las hDPSC provenientes de terceros molares de distintos donantes que mantuvieron una morfología típica con características fibroblastoide, una adherencia al plato de cultivo así como su caracterización de diferenciación a linajes osteogénico, conrogénico y adipogénico conforme a los lineamientos internacionales de la Sociedad Internacional de Terapia Celular.
- La cuantificación de la proliferación celular mediante ensayo MTT del efecto del UT incrementó la viabilidad celular de forma significativa siendo el parámetro del grupo 8 (Modo pulsado, 1 MHz, 1.0 W/cm<sup>2</sup> por 10 minutos) incrementó la proliferación celular de hDPSC en un 141 %.
- Los parámetros de UT del grupo 8 mostraron una disminución significativa de la expresión de PGE<sub>2</sub> en el cultivo celular y así demostró su efecto desinflamatorio mediante ensayo ELISA.
- En cuanto a la diferenciación del linaje celular utilizando UT se observaron características morfológicas celulares de diferenciación mediante el análisis en microscopio estereoscópico del co-cultivo con hDPSC + C2C12 y marcaodres positivos a la actina de las células mediante inmunocitoquímica confirmando la diferenciación positiva mediante co-cultivos celulares; logrando así ampliar el conocimiento que se tiene de la potencial aplicación del UT en el campo de la medicina regenerativa.

## 14 Limitates del estudio

Las limitantes del estudio se centraron en que el estudio se realizó de manera *in vitro* y con un control estricto de las variables, únicamente realizando los conteos finales de las variables dependientes, el estudio se realizó hasta tener una población adecuada para la observación de los efectos provocados. La literatura no arroja parámetros estandarizados de la utilización de UT, es por ello que investigaciones a futuro deberán enfocarse en evaluar los posibles efectos que podría tener la aplicación del UT con estos objetivos y ampliar más los mecanismos desinflamatorios para diseñar estrategias terapéuticas más dirigidas, asimismo el uso de modelos animales que conjunten el uso de hDPSC y UT para acelerar la regeneración de tejidos e incluso diseñar terapias de resituación celular en lesiones donde así lo requieran, acelerar los procesos de regeneración y la manera en que se dan los cambios bioquímicos en las células.

## 15 Relevancia clínica

Este estudio ayudó a sumar investigación científica para uno de los agentes físicos más utilizados en la práctica clínica de la fisioterapia, ya que se corroboraron sus efectos *in vitro*, se logró demostrar los efectos que provoca el uso del UT a nivel bioquímico en células troncales de pulpa dental humana de acuerdo a los parámetros utilizados. De igual manera se puede llevar este conocimiento al ámbito clínico para el estudio y tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas del musculo-esquelético y continúa involucrando a la fisioterapia en el campo de la investigación, fomentando su participación en equipos multidisciplinarios, utilizando de una manera benéfica para el paciente los agentes físicos, que pretenden utilizarse también con objetivos como la diferenciación celular, regeneración de tejidos, y así ofrecer a los pacientes, tratamientos óptimos, eficientes y poco invasivos.

## 16 Bibliografía

1. Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A Muscle Contusion Injury Model: Biomechanics, Physiology and Histology. *Am J Sports Med* [Internet]. 1994 Sep 23;22(5):702–10. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/036354659402200521>.
2. Viladot A, et al. *Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor*. Springer, editor. 2011. 340 p.
3. Blankenbaker D, Tuite M. Temporal Changes of Muscle Injury. *Semin Musculoskelet Radiol* [Internet]. 2010 Jun 18;14(02):176–93. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1253159>.
4. Muñoz SC. Lesiones musculares deportivas: Diagnostico por imagenes. *Rev Chil Radiol*. 2002;8(3):127–32.
5. Lazzaretti T, Pedrinelli A, Hernandez AJ. Muscle injury - Physiopathology, Diagnosis, Treatment and clinical presentation *Rev Bras Ortop*. 2011;46(3):247-55.
6. Corona BT, Rivera JC, Owens JG, Wenke JC, Rathbone CR. Volumetric muscle loss leads to permanent disability following extremity trauma. *J Rehabil Res Dev*. 2015;52(7):785–92.
7. Corona BT, Rivera JC. Inflammatory and Physiological consequences of debridement of fibrous tissue after volumetric muscle loss injury. *Clin Transl Sci*. 2018 Mar; 11(2):208-2017.
8. Hughes-Fulford M. Signal Transduction and Mechanical Stress. *Sci Signal* [Internet]. 2004 Sep 7;2004(249):re12. Available from: <http://stke.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/stke.2492004re12>.
9. Gusmão CVB, Belangero WD. Como a célula óssea reconhece o estímulo mecânico? *Rev Bras Ortop* [Internet]. 2009;44(4):299–305. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-36162009000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-36162009000400003&lng=pt&nrm=iso&tlng=en).
10. Matheus J, Oliveira F, Gomide L, Milani J, Volpon J, Shimano A. Efeitos do ultra-som

- terapêutico nas propriedades mecânicas do músculo esquelético após contusão. Rev Bras Fisioter [Internet]. 2008 Jun;12(3):241–7. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-35552008000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-35552008000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt).
11. Aya H. Experimentos de ondas usando transductores de ultrasonido. Rev Cuba Física. 2010;27(2):151–4.
  12. Cameron MH. Agentes Físicos en Rehabilitación de la Investigación a la Práctica. 4th Ed. Elsevier 2014. 419 p. 1773-201.
  13. Cameron MH. Agentes Físicos en Rehabilitación de la investigación a la práctica. 3rd Ed. Elsevier, editor. 2009. 457 p.
  14. Ojeh NO, Navsaria HA. An in vitro skin model to study the effect of mesenchymal stem cells in wound healing and epidermal regeneration. J Biomed Mater Res A. 2014;102(8):2785–92.
  15. Hughes CC. Endothelial-stromal interactions in angiogenesis. Curr Opin Hematol. 2008;13(3):204–9.
  16. Wong T, McGrath JA Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. Br J Dermatol. 2007;156(6):1149–55.
  17. Hendrickx B, Verdonck K, Van den Berge S, Dickens S, Eriksson E, Vranckx JJ, Luttun A. Integration of blood outgrowth endothelial cells in dermal fibroblast sheets promotes full thickness wound healing. Stem Cells. 2010;27(7):1165–77.
  18. Olfert IM, Baum O, Hellsten ES. Advances and challenges in skeletal muscle angiogenesis. Am J Physiol Hear Circ Physiol. 2016;310(3):H326–36.
  19. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredjet EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. Stem Cells. 2007;25(10):2648–59.
  20. Rodríguez E, Ramírez L. Uso del ultrasonido terapéutico pulsado en el tratamiento de personas con osteoartritis de rodilla/Pulsed therapeutic ultrasound in the treatment of persons with knee osteoarthritis. Rev la Univ Ind Santander [Internet]. 2015;47(473):337–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.18273/revsal.v47n3-2015010>
  21. O'Brien WD. Ultrasound-biophysics mechanisms. Prog Biophys Mol Biol. 2007;93(1–3):212–

- 55.
22. Rodríguez M. *Electroterapia en Fisioterapia*. Tercera ed. Editorial Medica Panamericana, editor. 2014. 625 p.
  23. S. K, Suslick. *Ultrasound: Its Chemical, Physical, and Biological Effects*. *Am Sci*. 1990;78(2):172.
  24. Harvey EN. *Biological Aspects of Ultrasonic Waves, a General Survey*. Univ Chicago Press. 1930;59(3):306–25.
  25. Izadifar Z, Babyn P, Chapman D. Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. *Ultrasound Med Biol* [Internet]. 2017 Jun;43(6):1085–104. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562917300522>.
  26. Goodman CE, Al-Karmi AM, Joyce JM, et al. The biological effects of therapeutic ultrasound: frequency dependence. In *Proceedings of the 14th annual meeting of the society for physical regulation in biology and medicine, Society for Physical Regulation in Biology and Medicine*, Washington, DC. 1994.
  27. Karmer J. Ultrasound: evaluation of its mechanical and thermal effects. *Arch Phys Med Rehabil*. 65:223–7.
  28. Mitragotri S. Healing sound: The use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(3):255–60.
  29. Harrison A, Lin S, Pounder N, Mikuni-Takagaki Y. Mode & mechanism of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) in fracture repair. *Ultrasonics* [Internet]. 2016;70:45–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultras.2016.03.016>.
  30. Warden SJ, Fuchs RK, Kessler CK, Avin KG, Cardinal RE, Stewart RL. Ultrasound Produced by a Conventional Therapeutic Ultrasound Unit Accelerates Fracture Repair. *Phys Ther* [Internet]. 2006 Aug 1;86(8):1118–1127. Available from: <https://academic.oup.com/ptj/article/86/8/1118/2857466/Ultrasound-Produced-by-a-Conventional-Therapeutic>.
  31. McNeill SC, Potts RO, Francoeur ML. Local Enhanced Topical Delivery (LETD) of Drugs: Does It Truly Exist? *Pharm Res*. 1992;9(11):1422–7.

32. Porter S. Diccionario de Fisioterapia [Internet]. Carcinogenesis. 2007. NP. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2526778>
33. De Oliveira PD, Pires-Oliveira DA, Pachco-Soares C, Fernandes SK, et al. Effect of therapeutic ultrasound of low intensity pulsed and continuous in fibroblastic cells in vitro. *Manual Therapy, Posturology & Rehabilitation Journal*. 2016;15: 1677-5937.
34. Teixeira CA, Ruano AE, Ruano MG, Pereira W, et al. Non-invasive temperature prediction of in vitro therapeutic ultrasound signals using neural networks. *Med Biol Eng Comput* 2006; 44: 111–116.
35. Davis JM. *Basic Cell Culture*. 2nd Ed. Oxford University Press. editor. 2002.
36. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 7th Ed. Wiley-Blackwell, editor. 2011.
37. Helgason, Cherly D, et al. *Basic cell culture protocols*. 2nd Ed. Human Press, editor. 2005.
38. Sons F. *Culture of animal Cells: A manual of basic technique*. 4th ed. Sons. JW&, editor. 2000.
39. Freemont P, Polizzi KM, Goers L. Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface* [Internet]. 2014;11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0065>.
40. Bogdanowicz DR, Lu HH. Studying cell-cell communication in co-culture. *Biotechnol J*. 2014;8(4):395–6.
41. Karp G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. 7th Ed. Fraga JdL. Companies M-H, editor. Madrid; 2011.
42. Passarge. *Genetica texto y atlas*. 3rd Ed. Wirth, editor. Madrid: Editorial medica panamericana; 2010.
43. Gil-Loyzaga P. *Cultivos de células animales y humanas aplicaciones en medicina regenerativa*. Libros V, editor. Madrid; 2011.
44. Yildirim S. Dental Pulp Stem Cells (DPSC). In: *Dental Pulp Stem Cells*. Springer. S in SC, editor. New York, NY; 2013.
45. Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent



- stem cells. *J Clin Investig*. 2010;120:51–9.
46. Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakou SL. A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration. *Int J Biol Sci*. 2009;5(3):226–43.
47. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(25).
48. D'aquino R, de Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: From biology to clinical applications. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol*. 2009;312(5):408–15.
49. Marrelli M, Codispoti B, Shelton RM, Scheven BA, Cooper PR, Tatullo M, et al. Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. *Front Physiol* [Internet]. 2018;9(November):1–9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01685/full>.
50. Li J, Id CN, Bian J, Sambo D, Brickler T, Zhang W, et al. A transient DMSO treatment increases the differentiation potential of human pluripotent stem cells through the Rb family. *PLoS One*. 2018;1–17.
51. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
52. Elia MC, Storer RD, Harmon LS, Kraynak AR, McKelvey TW, Hertzog PR, et al. Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay. *Mutat Res* [Internet]. 1993;291(3):193–205.
53. Young FM, Phungtamdet W, Sanderson BJ. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol Vitro*. 2005;19(8):1051–9.
54. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods*. 1995;179(1):95–103.
55. Patricia C, Camacho C, Ancizar F, Gutierrez A. Evaluacion preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando metodos colorimetricos In vitro preliminary

- cytotoxicity testing of vegetal extracts, using colorimetric methods. *Rev Colomb Biotecnol.* 2003;4(1):100–6.
56. Denizot F y Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986;89(2):271–7.
57. Riss TL, Moravec RA. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *Assay Drug Dev Technol.* 2004;2(1):51–62.
58. O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim.* 2002;36(3):313–21.
59. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van-Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315–9.
60. Pauwels B, Korst AE, de Pooter CM, Pattyn GG, Lambrechts HA, et al. Comparison of the sulforhodamine B assay and the clonogenic assay for in vitro chemoradiation studies. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003;51:221–6.
61. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107–12.
62. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1112–6.
63. Banasiak D, Barnetson AR, Odell RA, Mameghan H, Russell PJ. Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. *Radiat Oncol Investig.* 1999;7(2):77–85.
64. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5421–6.
65. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol Vitro.* 2001;15(3):257–9.
66. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT

- assays for high through-put screening. *Toxicol Vitro*. 2004;18(5):703–10.
67. Møller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005;96(SUPPL. 1):1–42.
  68. Kiskinis E, Suter W, Hartmann A. High throughput Comet assay using 96-well plates. *Mutagenesis*. 2002;17(1):37–43.
  69. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. 2008 May;23(3): 143–51.
  70. Banáth JP, Kim A, Olive PL. Overnight lysis improves the efficiency of detection of DNA damage in the alkaline comet assay. *Radiat Res*. 2001;155(4):564–71.
  71. Olive PL, Wlodek D, Banáth JP. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res*. 1991;51(17):4671–6.
  72. Merk O, Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Mol Mutagen*. 1999;33(2):167–72.
  73. Olive PL, Frazer G, Banáth JP. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res*. 1993;136(1):130–6.
  74. Speit G, Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol*. 2006 Jan;314:275–86.
  75. Ozaki Y, Šašić S. Introduction to Raman Spectroscopy. *Pharmaceutical Applications of Raman Spectroscopy*. 2007;1–28.
  76. Notingher I, Hench LL. Raman microspectroscopy: a noninvasive tool for studies of individual living cells in vitro. *Expert Rev Med Devices*. 2006;3(2):215–34.
  77. Notingher I, Selvakumaran J, Hench LL. New detection system for toxic agents based on continuous spectroscopic monitoring of living cells. *Biosens Bioelectron*. 2004;20(4):780–9.
  78. Notingher I, Verrier S, Haque S, Polak JM, Hench LL. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells. *Biopolymers*. 2003;72(4):230–40.
  79. Uzunbajakava N, Lenferink A, Kraan Y, Volokhina E, Vrensen G, Greve J, et al. Nonresonant Confocal Raman Imaging of DNA and Protein Distribution in Apoptotic Cells.

- Biophys J. 2003;84(6):3968–81.
80. Vega Robledo GB. Inflamación. Rev Fac Med UNAM. 2008;51(5):220–2.
81. Leung MC, Ng GY, Yip K. Effect of ultrasound on acute inflammation of transected medial collateral ligaments. *Arch Phys Med Rehabil* [Internet]. 2004 Jun;85(6):963–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003999303010268>.
82. Wong RA, Schumann B TR. A survey of therapeutic ultrasound use by physical therapists who are orthopaedic certified specialists. *Phys Ther*. 2007;87:986–94.
83. Watson T. Ultrasound in contemporary physiotherapy practice. *Ultrasonics*. 2008;48(4):321–9.
84. Wood RW, Loomis AL. The physical and biological effects of high frequency sound waves of great intensity. *Journal of Franklin Institute*. 1928 Jan;205(1):151-153.
85. Warden SJ, McMeeken JM. Ultrasound usage and dosage in sports physiotherapy. *Ultrasound Med Biol* [Internet]. 2002 Aug;28(8):1075–80. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562902005525>.
86. Chapelon JY, Cathignol D, Cain C, Ebbini E, Kluiwstra JU, Sapozhnikov OA, et al. New piezoelectric transducers for therapeutic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* [Internet]. 2000 Jan;26(1):153–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562999001209>.
87. Jarosz BJ. Measurement of Acoustic Output of Ultrasound Instrumentation for Interstitial Thermal Therapy. 2007 IEEE Instrum Meas Technol Conf IMTC 2007 [Internet]. 2007;1–5. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/lpdocs/epic03/wrapper.htm?arnumber=4258338>.
88. Fellingervorstand K. Klinik und therapie des chronischen gelenkrheumatismus. *American Journal of Clinical Pathology*. 1954 Sep;24(9):1709.
89. Griffin, JE Touchstone J. Ultrasonic movement of cortisol into pig tissues. I: movement into skeletal muscle. *Am J Phys Med*. 1963;42:77–85.
90. Griffin, JE Touchstone J. Effects of ultrasonic frequency on phonophoresis of cortisol into

- swine tissues. *Am J Phys Med.* 1972;51:62–78.
91. Arias J. *Técnicas Básicas en Cultivos Celulares.* Ewe, editor. 2012. 188 p.
92. Huggins J. Alternatives to animal testing: research, trends, validation, regulatory acceptance. *Altern to Anim Exp.* 2003;20(1):3–61.
93. Abrunhosa VM, Soares CP, Batista Possidonio AC, Alvarenga AV, Costa-Felix RPB, Costa ML, et al. Induction of Skeletal Muscle Differentiation In Vitro by Therapeutic Ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* 2014;40(3):504–12.
94. Gao Q, Walmsley AD, Cooper PR, Scheven BA. Ultrasound Stimulation of Different Dental Stem Cell Populations: Role of Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. *J Endod* [Internet]. 2016 Mar;42(3):425–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26830427>.
95. Chen AW, Klimas A, Zderic V, Castellanos IS, Entcheva E. Preliminary Findings on Ultrasound Modulation of Derived Cardiomyocytes. 2017 IEEE Ultrason Symp. 2017;21–4.
96. Corona BT, Wenke JC WC. Pathophysiology of volumetric muscle loss injury. *Cells Tissues Organs.* 2016;202(3–4):180–8.
97. Greising SM, Dearth CL, Corona BT. Regenerative CBT. Rehabilitative medicine: a necessary synergy for functional recovery from volumetric muscle loss injury. *Cells Tissues Organs.* 202(3):237–49.
98. Artilheiro PP, Oliveira EN, Viscardi CS, Martins MD, Bussadori SK, Fernandes KPS, et al. Efeitos do ultra-som terapêutico contínuo sobre a proliferação e viabilidade de células musculares C2C12. *Fisioter e Pesqui* [Internet]. 2010 Jun;17(2):167–72. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1809-29502010000200013&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-29502010000200013&lng=pt&tlng=pt).
99. Ferrari RJ, Picchi LD, Botelho AP, Minamoto V. Processo De Regeneração Na Lesão Muscular: Uma Revisão. *Fisioter em Mov.* 2005;18(2):63–71.
100. Merrick MA, Bernard KD, Devor ST, Williams JM. Identical 3-MHz Ultrasound Treatments With Different Devices Produce Different Intramuscular Temperatures. *J Orthop Sport Phys Ther* [Internet]. 2003 Jul;33(7):379–85. Available from:

<http://www.jospt.org/doi/10.2519/jospt.2003.33.7.379>.

101. Padilla F, Puts R, Vico L, Raum K. Stimulation of bone repair with ultrasound: A review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics*. 2014;54(5):1125–45.
102. Azaharez M. Efectividad del ultrasonido terapéutico en el tratamiento de la espasticidad del miembro superior pléjico. *Correo Cient Med Holguín*. 2017;(1):204–18.
103. Parvizi J, Parpura V, Greenleaf JF, Bolander ME. Calcium signaling is required for ultrasound-stimulated aggrecan synthesis by rat chondrocytes. *J Orthop Res [Internet]*. 2002 Jan;20(1):51–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0736-0266%2801%2900069-9>.
104. Dinno MA, Crum LA, Wu J. The effect of therapeutic ultrasound on electrophysiological parameters of frog skin. *Ultrasound Med Biol [Internet]*. 1989 Jan;15(5):461–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0301562989900999>.
105. Tassinari J, Lunardelli A, Basso BS, Stülp S, Pozzobon A, Pedrazza L, et al. Therapeutic ultrasound stimulates MC3T3-E1 cell proliferation through the activation of NF- $\kappa$ B1, p38 $\alpha$ , and mTOR. *Lasers Surg Med*. 2015;47(9):765–72.
106. Guyton A, et al. *Tratado de fisiología médica*. 12va. Elsevier, editor. 2011. 1092 p.
107. Burbano S. *Física General*. 32va Ed. Tebar, editor. 2003. 800 p.
108. Bakkar M, Liu Y, Fang D, Stegen C SX. A Simplified and Systematic Method to Isolate, Culture and Characterize Multiple Types of Human Dental Stem Cells from a Single Tooth. *Adult Stem Cells: Methods and Protocols. Methods Mol Biol*. 2017;1553.
109. Dominici M, Le Blanc K, Muller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):325–7.
110. Sensebe L, Tarte K, Galipeau J, Krampera M, Martin I, Phinney DG, Shy Y. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10(1):9–10.
111. Duailibi MT, Kulikowski LD, Duailibi SE, Lipay MV, Melaragno MI, Ferreira LM, Vacanti JP YP. Cytogenetic instability of dental pulp stem cell lines. *J Mol Histol*. 2012;43(1):89–94.

112. Kang KS, Lee SJ, Lee H, Moon W, Cho DW. Effects of combined mechanical stimulation on the proliferation and differentiation of pre-osteoblasts. *Exp Mol Med*. 2011;43(6):367–73.
113. Feres MFN, Kucharski C, Diar-Bakirly S, El-Bialy T. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the activity of osteoclasts: An in vitro study. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2016;70:73–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.06.007>.
114. Cohen G, Natsheh H, Sunny Y, Bawiec CR, Touitou E, Lerman MA, et al. Enhanced therapeutic anti-inflammatory effect of betamethasone on topical administration with low-frequency, low-intensity (20 kHz, 100 mW/cm<sup>2</sup>) ultrasound exposure on carrageenan-induced arthritis in a mouse model. *Ultrasound Med Biol* [Internet]. 2015 Sep;41(9):2449–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26003010>.
115. Casimiro L, Brosseau L, Welch V Milne S, Judd M, Well G, et al. Therapeutic ultrasound for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Libr* John Wiley Sons, Ltd. 2002;(7).
116. Karp G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. Posibilidad de un tratamiento conreemplazo celular. 6th Ed. Fraga JdL. Companies M-H, editor. Madrid; 2011. 19-23.
117. Pisciotta A, Riccio M, Carnevale G, Lu A, De Biasi S, Gibellini L, La Sala GB, Bruzzesi G, Ferrari A, Huard J, De Pol A. Stem cells isolated from human dental pulp and amniotic fluid improve skeletal muscle histopathology in mdx/SCID mice. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(156).

## 17 Productividad del Proyecto



  
Sociedad Cubana  
de Estomatología

  
ENSAP

**VISION SALUD BUCAL**  
**VIII SIMPOSIO NACIONAL**

ENCUENTRO INTERNACIONAL DE ESTOMATOLOGÍA  
CERTIFICADO

**A: Sandra D. Sordo Carrillo, Ángel D. Paulino González, Laura S. Acosta-Torres, Cristina Carrillo Prado, Dr.C René García-Contreras (México).**

.....

**Título: Efecto del ultrasonido terapéutico en la proliferación y antiinflamatorio de células troncales de la pulpa dental humana**  
.....

.....

Conferencia  Mesa Redonda  Tema Libre  Cartel comentado

DICTAMEN No.  CARTON

La Habana, 18 y 19 de octubre de 2018

  
Presidente

  
Secretario



Cover Letter

Leon, Guanajuato, México, 03-07-2019.

Christy K. Holland, Ph.D.,  
Editor-in-Chief, *Ultrasound in Medicine and Biology*

Submission of manuscript “**Therapeutic ultrasound proliferative, anti-inflammatory and differentiation effect on hDPSC** by Sordo-Carrillo *et. al* for editorial evaluation to *Ultrasound in Medicine and Biology*.

Enclosed please find a manuscript that is being submitted for editorial evaluation to *Ultrasound in Medicine and Biology*. All authors have approved the manuscript. This manuscript is an original paper, has not been published before, and is not under consideration for publication in another journal at the present time.

The copyright to this article is transferred to *Ultrasound in Medicine and Biology* effective if and when the article is accepted for publication.

Corresponding author: Rene Garcia-Contreras ENES Unidad León, Blvd. UNAM 2011, Predio el Saucillo y el Potrero, Comunidad de los Tepetates, León 37684, Guanajuato. e-mail: [dentist.garcia@gmail.com](mailto:dentist.garcia@gmail.com) Phone number: 01 (477) 194 0800 Ext. 43463

Sincerely,

Rene Garcia-Contreras  
DDS, MDS & PhD

26/4/2019

Gmail - 2019 IADR/AADR/CADR General Session-Poster Presentation Acceptance Letter



Sandra Sordo <sandrasordo28@gmail.com>

---

## 2019 IADR/AADR/CADR General Session-Poster Presentation Acceptance Letter

---

2019 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition <onbehalf@abstractcentral.com> 19 de marzo de 2019, 11:25  
Responder a: meetings@iadr.org  
Para: sandrasordo28@gmail.com

Tuesday, 19-Mar-2019

Sandra Sordo-Carrillo  
León, Mexico

Abstract Control ID#: 3181460  
Abstract Title: Therapeutic Ultrasound on Proliferation, Desinflammatory Effect and Differentiation in Culture-hDPSC

Dear Sandra Sordo-Carrillo,

It is a pleasure to inform you that your abstract has been ACCEPTED for poster presentation at the 2019 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. The meeting will take place at the Vancouver Convention Centre, Vancouver, BC, Canada.

Please note that some colleagues have provided an alternate email address for notification, so if this letter is addressed to a colleague, please forward it to his/her attention. Email notifications are sent only to the address provided for the presenter when the abstract was submitted; it is the presenter's responsibility to notify co-authors.

DO NOT lose this notification. The mode of your presentation has been assigned by the Group Program Chair and must be followed as we are unable to change it at this date. Assignments were based on authors' requests as much as possible. If you have arranged your travel already and you arrive later or depart earlier than your assigned presentation time, we will not be able to move your presentation to accommodate your travel plans. Please note that your final presentation number will be assigned in May.

### **PRESENTATION INFORMATION**

Presentation Mode: Poster Session  
Presentation Date: June 22, 2019  
Session Title: Translational Approaches  
Session Time: 3:45 PM - 5:00 PM

Poster session set-up, tear down, viewing times and other important presentation information is available at <https://www.iadr.org/IADR/Meetings/IADR-AADR-CADR-General-Session-Vancouver-Canada/Poster-Presentation-Guidelines>.

### **POSTER SIZE**

The board will be used **VERTICALLY**. Dimensions of the poster board are 7 feet high x 3 feet wide. These are the maximum dimensions to follow when creating your poster but you should make your poster smaller.

Presenters should bring their own adhesive for their poster. IADR suggests reusable command strips. Take into consideration the poster material and size when planning the amount of adhesive to bring.

### **PRE-REGISTRATION REQUIREMENT**

All presenters must pre-register and pay the applicable fee by the **April 16, 2019** presenter pre-registration deadline. If you do not pre-register, you will NOT be allowed to present at the meeting and your abstract will be withdrawn from the final printed Program Book and will not be citable as appearing in the special edition of the *Journal for Dental Research*.

Approximately one week after the presenter registration deadline, a notification confirming your participation with your final

<https://mail.google.com/mail/u/0?ik=4c141aa8f3&view=pt&search=all&permmsgid=msg-f%3A1628451888951791500&simpl=msg-f%3A1628451888951791500> 1/3