

Revisión sistemática de los efectos de microvibración de baja magnitud alta frecuencia en osteocitos cultivados.

Systematic review of the effects of low intensity high frequency microvibration on osteocytes cultivated.

Luis Jonathan Sebastián González,* Rosina E Villanueva Arriaga,*‡ Nelly Molina Frechero,*‡ Elizabeth Hernández Pérez,§ Salvador García López¶

RESUMEN

Introducción: El hueso, reservorio de minerales y moléculas orgánicas, es un tejido dinámico que detecta y se adapta a las cargas mecánicas de los órganos y tejidos del cuerpo, el cual mantiene la estructura ósea del esqueleto durante el crecimiento y a través de la vida del ser humano. Las células óseas son sensibles a las cargas mecánicas y microvibraciones que recibe el esqueleto. **Objetivo:** El propósito de este estudio fue realizar una revisión sistemática acerca de los efectos que ejerce la microvibración de alta frecuencia-baja intensidad, en osteocitos cultivados *in vitro* sobre la síntesis de factores solubles, con el propósito de entender si la microvibración tiene influencia en la aceleración del movimiento dentario. **Material y métodos:** Se realizó una búsqueda de artículos de revisión de osteocitos y otras células óseas *in vitro*, a través de la estrategia PICO (Paciente, Intervención, Comparación, Resultado [*Outcome*]), con el empleo de palabras clave como: «osteocitos», «microvibración», «remodelación», «osteoclastogénesis», «citocinas» y «osteoblastos». Se estructuró por medio de PRISMA (informe de revisiones sistemáticas y meta-análisis). La captación de datos finales se hizo por medio del método de puntuación de calidad Jadad y Cochrane (modelo de correlación) como herramientas para evaluar el riesgo de sesgo de cada uno de los artículos. Se incluyeron 11 artículos con alta calidad metodológica. **Resultados:** La mayoría de los experimentos *in vitro* demostraron que la microvibración tuvo un aumento estadísticamente significativo en la proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC), en osteoblastos (MC3T3-E1), en la expresión de proteínas para inducir osteogénesis y

ABSTRACT

Introduction: The bone reservoir of minerals and organic molecules is a dynamic tissue that detects and adapts to the mechanical loads of the organs and tissues of the body, which maintains the bone structure of the skeleton during growth and throughout the life of the human being. bone cells are sensitive to mechanical loads and microvibrations received by the skeleton. **Objective:** The purpose of this study was to carry out a systematic review about the effects exerted by high frequency-low intensity micro-vibration in osteocytes cultured *in vitro* on the synthesis of soluble factors, to understand if micro vibration has an influence on the acceleration of tooth movement. **Material and methods:** A search was carried out for review articles on osteocytes and other bone cells *in vitro*, establishing the PICO strategy, using keywords such as: «osteocytes», «micro-vibration», «remodeling», «osteoclastogenesis», «cytokines», «osteoblasts», was structured using PRISMA and final data capture using the Jadad and Cochrane method, evaluating the risk of bias of each of the articles. Eleven articles with high methodological quality were included. **Results:** Most of the *in vitro* experiments showed that micro-vibration had a statistically significant increase in the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells (MSC), in osteoblasts (MC3T3-E1) in the protein expression to induce osteogenesis, osteocytes (MLO-Y4) upregulated the expression of osteoprotegerin (OPG), prostaglandin (PGE2) and nitrous oxide (NO) by altering and regulating soluble factors such as cytokines, growth factors and chemokines of the other cells, in addition to showing a decrease in osteoclast activity

* Maestría en Ciencias Odontológicas, Universidad Autónoma Metropolitana-X.

‡ Departamento de Atención a la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-X.

§ Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

¶ Universidad Intercontinental. Hospital General «Dr. Manuel Gea González», UNAM.

Ciudad de México (CDMX).

Recibido: 20 de marzo de 2022. Aceptado: 11 de abril de 2022.

Citar como: Sebastián GLJ, Villanueva ARE, Molina FN, Hernández PE, García LS. Revisión sistemática de los efectos de microvibración de baja magnitud alta frecuencia en osteocitos cultivados. Rev ADM. 2022; 79 (3): 165-176. <https://dx.doi.org/10.35366/105831>



en los osteocitos (MLO-Y4). Asimismo, sobreregularon la expresión de osteoprotegerina (OPG), prostaglandina (PGE2) y óxido nítrico (NO) al alterar y regular los factores solubles como las citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas, de las demás células, además de mostrar una disminución en la actividad de los osteoclastos (RAW246.7) en la resorción ósea. **Conclusión:** La microvibración induce remodelación ósea. Los osteocitos son sensibles a los estímulos mecánicos y producen factores solubles para inducir la remodelación ósea, razón por la cual se emplea la microvibración como una terapia innovadora y prometedora, no invasiva y no farmacológica en la estimulación de la formación ósea de la superficie del hueso.

Palabras clave: Osteocitos, microvibración, remodelación, osteoclastogénesis, citocinas.

(RAW246.7) in bone resorption. **Conclusion:** Micro-vibration induces bone remodeling, osteocytes are sensitive to mechanical stimuli and produce soluble factors to induce bone remodeling, therefore micro-vibration is used as an innovative and promising non-invasive and non-pharmacological therapy, in stimulating bone formation on the bone surface.

Keywords: Osteocytes, micro-vibration, remodeling, osteoclastogenesis, cytokines.

INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido dinámico; detecta y se adapta a la carga mecánica¹ del peso del cuerpo a través del proceso de remodelación ósea en forma continua, resultado del equilibrio regulado entre osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y las células de revestimiento de la superficie del hueso, que son células mecanosensoriales.²

Los osteocitos son las células más abundantes que representan de 90-95% del total de las células óseas en el esqueleto adulto. Descienden de los osteoblastos provenientes de células mesenquimatosas. Son los principales reguladores de la mecanosensación y mecanotransducción ósea.³ Atrapados dentro de la matriz ósea en el tejido calcificado, los osteocitos envían largas proyecciones celulares a través de túneles canaliculares que generan una red interconectada.⁴ Por medio del sistema lacunocanalicular, la energía mecánica se convierte en señales eléctricas y/o bioquímicas.⁵ Se cree que los osteocitos son los principales orquestadores de la remodelación ósea bajo el estímulo mecánico al enviar señales a otras células óseas efectoras a través de factores solubles autocrinos y paracrinos, además del contacto directo célula-célula, el cual tiene el control directo de la diferenciación y actividad de los osteoclastos o de los osteoblastos.⁶ Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares de los efectos mediados por los osteocitos sobre la salud esquelética no se han dilucidado por completo,⁷ ya que muchas citocinas, hormonas y vías de señalización están involucradas en este proceso, jugando un papel importante en la resorción ósea fisiológica o patológica, como es el caso de la artritis reumatoide, enfermedades periodontales y osteoporosis posmenopáusica, entre otras.

Estudios recientes han demostrado que diferentes citocinas pueden inducir el factor de transcripción Kappa B ligando (RANKL),^{8,9} el cual puede inducir la osteoclastogénesis o inhibir la actividad osteoclástica por el decodificador natural denominado osteoprotegerina (OPG),¹⁰ dos citocinas sintetizadas tanto por osteocitos como los osteoblastos que constituyen un sistema ligando-receptor conocido como tríada RANK/RANKL/OPG, que ajusta directamente los pasos finales de la cascada de la resorción ósea;¹¹ en tanto RANKL —expresado por los osteoblastos— se une con el receptor RANK en la superficie de los monocitos para su diferenciación de osteoclastos y sus precursores para activar su función. Por su parte, la OPG protege al esqueleto de la resorción ósea excesiva al decodificar a RANKL e inhibir la diferenciación osteoclástica.¹²

En 1892, el anatomista y cirujano Julius Wolff postuló que la remodelación ósea no sólo está influenciada por factores biológicos, sino también bajo un estricto control mecánico para una adaptación más eficiente a las situaciones de carga cambiante. Frost insistió en que diferentes rangos de carga biomecánica provocaron la formación o reabsorción ósea.^{13,14}

Las microvibraciones de baja magnitud (LM; < 1 g, donde $g = 9,98 \text{ m/s}^2$), de alta frecuencia (HF; 20-90 Hz) han ganado interés en tanto que los estudios muestran que dicha señal mecánica puede influir positivamente en la homeostasis esquelética.¹⁵ Este tipo de microvibración podría ser una alternativa de tratamiento no invasiva y no farmacológica eficiente para los trastornos y la regeneración ósea, ya que experimentos *in vitro* han demostraron que el LMHFV es capaz de mejorar la proliferación de células madre mesenquimales (MSC) y osteoblastos. Además, acelera la diferenciación osteogénica y se inhibe la diferenciación osteoclastogénica.¹⁶

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio que reportamos se realizó con la descripción de componentes PICO,¹⁷ para formular la pregunta de investigación y poder establecer los criterios de inclusión y exclusión. Se cuidó que fueran artículos científicos originales publicados entre 2010 y 2020, con texto completo en idioma inglés y de libre acceso. La búsqueda se realizó en bases de datos electrónicas como PubMed, Google Scholar, ScienceDirect y Medline. La selección de la bibliografía se estructuró con el método PRISMA para revisiones sistemáticas. Se agregaron operadores booleanos para la combinación de búsqueda, con la utilización de palabras clave como: «*vibration, osteocyte, cytokines and bone*» e implementando los criterios de inclusión y exclusión.

La selección de artículos se realizó con dos revisores independientes que se basaron en el título y *abstract* de acuerdo con los criterios de selección. Para excluir artículos irrelevantes se revisó completamente cada uno de los

textos. Se elaboraron tablas para evaluar los resultados y analizar los datos cualitativos relevantes y categorizarlos como las variables más importantes para realizar la revisión sistemática.

La calidad metodológica se evaluó por medio de siete ítems con el método Jadad y el riesgo de sesgo de los artículos con Cochrane, con lo que se derivó una calificación a cada artículo con el término bajo riesgo, algunas inquietudes, o bien, alto riesgo de sesgo, cuando las variables no fueron claras.

RESULTADOS

En la búsqueda PRISMA¹⁸ se identificaron 93 artículos, de los cuales 11 fueron seleccionados para analizar el texto completo a profundidad haciendo referencia a los criterios de inclusión y exclusión en el trabajo de revisión (*Figura 1*). Así, quedaron trabajos en donde se aplicó microvibración con un sistema controlado en células óseas *in vitro* pertenecientes a líneas celulares o

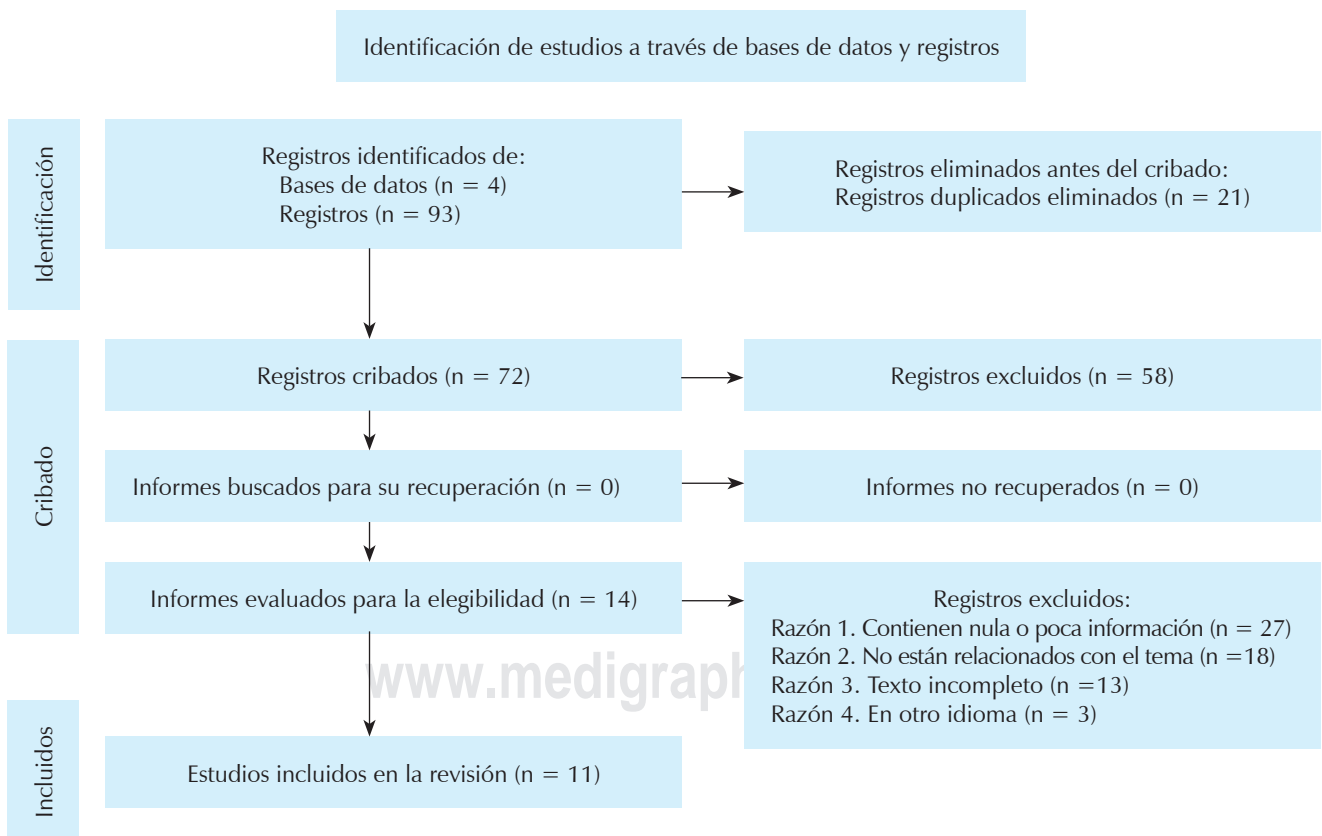


Figura 1: Diagrama de flujo PRISMA de selección de estudios.

Tabla 1: Resumen de los estudios incluidos.

Autor	Células	País	Dispositivo de vibración	Título
Lau et al. (2010)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos) y RAW264.7 (osteoclastos)	Canadá	Vibrador (ET-127, Labworks Inc) (0.3 g a 30, 60, 90 Hz)	Efecto de la vibración de baja magnitud y alta frecuencia sobre los osteocitos en la regulación de éstos
Lau et al. (2011)	(MSC) de médula ósea de ratón	Canadá	Vibrador (ET-127, Labworks Inc) (0.3 g a 60 Hz)	Efecto de la vibración de baja magnitud y alta frecuencia en la diferenciación osteogénica de células estromales mesenquimales de rata
Li et al. (2012)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos)/MC3T3-e1 (osteoblastos)	China	Transductor para un SAFHS (Sonic Accelerated Fracture Healing System, NexSound, China) (1.5M Hz)	Los ultrasonidos pulsados de baja intensidad regulan la proliferación y diferenciación de los osteoblastos a través de los osteocitos
Wu S et al. (2012)	Línea celular RAW264.7 (osteoclastos)	China	No especificado (0.3 g a 45 Hz)	La vibración de baja magnitud y alta frecuencia inhibe la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL en las células RAW264.7
Uzer. (2014)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos)	USA	Vibrador (Foneng Technologies Co., Ltd., China) (0.15, 1 g a 30 y 100 Hz)	La comunicación de brecha en los osteocitos se amplifica con vibraciones de baja intensidad <i>in vitro</i>
Wu et al. (2016)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos)	China	Vibrador (Foneng Technologies Co., Ltd., China) (0.4 g a 10, 30, 60 y 90 Hz)	La bio-respuesta de los osteocitos y su regulación en los osteoblastos bajo vibración
Maredziak et al. (2017)	Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC)	Polonia	Vibraciones generadas por un dispositivo electromagnético (0.3 g a 25, 35, 45 Hz)	El efecto de las vibraciones de baja magnitud y baja frecuencia (VMBF) sobre el potencial de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales humanas derivadas del tejido adiposo
Hao et al. (2017)	Línea celular RAW264.7 (osteoclastos) y MLO-Y4 (osteocitos)	China	No especificado (2 Hz)	Los osteocitos regulan la diferenciación de los osteoblastos y la actividad de los osteoclastos a través de la Interleucina-6 bajo carga mecánica
Judex y Pongkitwitoon (2018)	Cultivo celular humano de osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos	USA	VPro5 (Propel Orthodontics 100 Hz) AcceleDent (OrthoAccel Technologies 30 Hz) No especificado (0.5 g a 48.3 Hz)	Eficacia diferencial de 2 dispositivos vibratorios de ortodoncia para alterar la respuesta celular en osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos
Sakamoto et al. (2019)	Línea celular RAW264.7 (osteoclastos) y MLO-Y4 (osteocitos)	Japón	No especificado (0.5 g a 48.3 Hz)	La vibración potencia la osteoclastogénesis al inducir la expresión de RANKL a través de la señalización de NF-κB en los osteocitos
García et al. (2020)	Cultivos primarios de medula ósea de ratón (osteoblastos)	México	AcceleDent® Aura (0.25 N; 30 Hz)	Las microvibraciones a 30 Hz sobre células óseas cultivadas <i>in vitro</i> producen factores solubles para la inhibición de los osteoblastos y la actividad de los osteoclastos

células primarias diferenciadas de ratón o humanos. Las características resultantes tomadas en cuenta fueron: el desarrollo en la proliferación de cada tipo de célula, su diferenciación y los cambios en la expresión de genes o proteínas.

La *Tabla 1* incluye los estudios seleccionados, todos ellos ensayos experimentales controlados. Cuenta con un resumen de la información general cómo: autor, año de la publicación, país de origen, estímulo de vibración, frecuencia e intensidad, tipo de proteína que se estudió, método de desarrollo celular y resultados obtenidos de cada artículo.

Riesgo de sesgo en los estudios seleccionados

Se evaluó la calidad de los 11 estudios seleccionados con base en el método Jadad¹⁹ (*Tabla 2*), para su revisión sistemática analizando la calidad y efectividad metodológica que éstos presentaran, a efectos de determinar en qué medida dichos estudios han abordado la posibilidad de sesgo en su diseño y realización. Por medio de siete ítems, se califican en una escala de 0 a 5 puntos. Así, más respuestas positivas (Sí), significan que el artículo es de una mayor calidad metodológica, mientras que más respuestas negativas (No), con puntuación inferior a 3, el ensayo es pobre en su calidad metodológica, donde: Sí = 1 punto y No = -1 punto.

Evaluación del riesgo de sesgo en los estudios

La herramienta de la colaboración Cochrane²⁰ permitió evaluar el riesgo de sesgo en los estudios utilizados para esta revisión sistemática (*Figura 2*). Se incluyeron los que pertenecieran a ensayos experimentales controlados *in vitro*, como fue el método de control, el tipo de dispositivo vibratorio y cómo se introdujeron las frecuencias requeridas. Se verificó que los resultados arrojados estuviesen completos en los ensayos, analizando que no existiera un conflicto de interés o riesgo de sesgo en alguna investigación, para la obtención y uso de los resultados en esta revisión.

Características y comparación de resultados

Se brinda el resultado del riesgo de sesgo en las *Tablas 3 y 4*. La mayoría de los 11 estudios clasificaron como de alta calidad metodológica, ya que abordaron adecuadamente la aplicación del dispositivo vibratorio, a excepción de cuatro por la poca información de cómo se indujo y el aparato utilizado para el estímulo. Seis estudios utiliza-

ron líneas celulares de osteocitos (MLO-Y4), evaluando diferentes tipos de proteínas. Dos de ellos realizaron un modelo de elementos finos y de cómo la microvibración repercute en la membrana, el núcleo y el citoesqueleto, así como la alteración de las proteínas de señalización, la modificación de la expresión molecular y celular de las demás células óseas. Los otros cinco se relacionaron con osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos y el cómo estas células interactúan sinérgicamente con los diferentes tipos de proteínas de las demás células para llevar a cabo la regeneración ósea.

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo una revisión sistemática para dilucidar los efectos que ejerce la microvibración de baja magnitud alta frecuencia (LMHF) sobre las células óseas, en particular en los osteocitos, en tanto que se presume que ésta altera la expresión de factores solubles. Asimismo, contribuye a la proliferación y diferenciación celular, así como a determinar los mecanismos celulares y moleculares que participan en la inhibición de la actividad y síntesis osteoclástica mediada por la microvibración y si esta respuesta influye en la actividad de los osteocitos, ya que la microvibración también estimula la actividad osteoblástica. La mayoría de los estudios se diferenciaron en cuanto a las intensidades de microvibración, así como por horarios diferentes, aunque todos estuvieron en el rango de 20 a 90 Hz.

Entre las señales que expresan los osteocitos en respuesta a la estimulación mecánica, se observaron el activador del receptor del ligando del factor nuclear κ B (RANKL) y su decodificador natural, las osteoprotegerinas (OPG). Tales citocinas también son secretadas por células osteoblásticas, la OPG molécula específica en la regulación de la actividad osteoclástica, ya que al bloquear la interacción entre RANKL-RANK se inhibe la formación y activación de osteoclastos.²¹⁻²³

Ha sido demostrado que las células madre mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de linajes: células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas y miogénicas.²⁴ Un estudio de Lau y colaboradores, con células madre mesenquimales (MSC), demostró que la microvibración no mejoró la diferenciación osteogénica, ya que la actividad y expresión de marcadores asociados a osteoblastos como fosfatasa alcalina (ALP), el gen Runx2, Osterix (Osx), colágeno tipo I alfa 1 (COLA1), sialoproteína ósea, osteopontina (OPN) y osteocalcina (OC). Necesarios para la osteogénesis, no

Tabla 2: Cuestionario Jidad modificado para la evaluación de riesgo de sesgo.

Estudio	¿Los objetivos fueron adecuados para la población de estudio?		¿Fueron estudios experimentales controlados?		¿Se describieron en detalle los sujetos de estudio y el entorno?		¿Se describe el método utilizado para la estimulación vibratoria en células óseas cultivadas?		¿Fue adecuado el tamaño de la muestra?		¿Se realizó el análisis de datos con una cobertura suficiente de la muestra identificada?		¿Hubo un análisis estadístico apropiado?	
	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No	Sí	No
Lau et al. 2010	1		1		1		1		1		1		1	
Lau et al. 2011	1		1		1		1		1		1		1	
Li et al. 2012	1		1		1	-1			1		1		1	
Wu et al. 2012	1		1		1		1		1		1		1	
Uzer et al. 2014	1		1		1	-1			1		1		1	
Wu et al. 2016	1		1		1		1		1		1		1	
Mareziak et al. 2017	1		1		1		1		1		1		1	
Hao et al. 2017	1		1		1	-1			1		1		1	
Judex y Pongkit-witoon 2018	1		1		1		1		1		1		1	
Sakamoto et al. 2019	1		1		1	-1			1		1		1	
García et al. 2020	1		1		1		1		1		1		1	

	¿Los objetivos fueron adecuados para la población de estudio?	¿Fueron estudios experimentales controlados?	¿Se describieron en detalle los sujetos de estudio y el entorno?	¿Se describe el método utilizado para la estimulación vibratoria en células óseas cultivadas?	¿Fue adecuado el tamaño de la muestra?	¿Se realizó el análisis de datos con una cobertura suficiente de la muestra identificada?	¿Hubo un análisis estadístico apropiado?
Lau, 2010	?	+	+	+	+	+	+
Lau, 2011	+	+	+	+	+	+	+
Li, 2012	?	+	+	?	+	+	+
Wu, 2012	+	+	+	+	+	+	+
Uzer, 2014	+	+	+	-	+	+	+
Wu, 2016	+	+	+	+	+	+	+
Maredziak, 2017	+	+	+	+	+	+	+
Hao, 2017	+	+	+	-	+	+	+
Judex & Pongkitwitoon, 2018	+	+	+	+	+	+	+
Sakamoto, 2019	+	+	+	-	+	+	+
García, 2020	+	+	+	+	+	+	+

Figura 2: Resumen de la calidad metodológica de los estudios y riesgo de sesgo.

presentaron alguna diferencia significativa.²³ Sin embargo, Maredziak²⁵ realizó una investigación con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC) y, a diferencia de Lau y colegas,²³ observaron un aumento en la proliferación y diferenciación osteogénica.

A 25 Hz, las células generaron cantidades tres veces mayores de calcio (Ca²) y seis veces mayores de fósforo (P), además de estructuras similares a la hidroxiapatita en comparación con el grupo control.²⁵ Con estos hallazgos se demuestra que en células MCS, la microvibración altera el compromiso del linaje al inhibir la adipogénesis²⁶ y tiene un efecto positivo sobre la diferenciación osteogénica, pero esto podría deberse al tiempo de microvibración en cada uno de los estudios *in vitro*.

La formación del hueso está mediada por osteoblastos y en su estado de maduración pasan a ser osteocitos incrustados en la matriz ósea. Éstos son muy sensibles a los estímulos mecánicos, lo que contribuye a la osteogénesis.¹⁶ Un estudio con medios de cultivo condicionados con células parecidas a osteoblastos MC3T3-E1 y estimu-

ladas por medio de ultrasonido pulsado de baja intensidad (LIPUS), que induce micromovimientos y produce estimulación mecánica, mostraron una inhibición en la proliferación de osteoblastos *in vitro*. Por otra parte, al añadir medios de cultivo de osteocitos (MLO-Y4), hubo un aumento en la actividad de la ALP y de factores solubles expresados como PGE₂ y óxido nítrico NO, un mediador soluble liberado por los osteocitos, ya que se ha implicado en la respuesta anabólica del hueso a la carga mecánica, lo cual sugiere que los osteocitos estimulados con baja intensidad ultrasónica (LIPUS) potencian la diferenciación de los osteoblastos en un modelo *in vitro*.^{27,28} Por otro lado, están las prostaglandinas de la serie E₂ (PGE 2), cuya síntesis es catalizada por la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual es una molécula de señalización que los osteocitos expresan en respuesta a los estímulos mecánicos. Contribuyen y actúan sobre los osteoblastos y osteoclastos con efectos estimulantes e inhibidores, al ser sometidos por una hora de microvibración a diferentes intensidades.¹⁵ Por lo tanto, la microvibración parece

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

Autor	Tiempo de vibración y días	Prueba de laboratorio	Análisis estadístico	Factores solubles que se evaluaron	Resultados del grupo experimental en comparación con el de control
Lau et al. (2010)	1 hora	ELISA	t de Student, ANOVA, p < 0.05	PGE ₂ , RANKL, OPG, COX-2	<ul style="list-style-type: none"> • OPG no fue alterado • COX -2 a 90 Hz se elevó 3.4 veces (p < 0.01) • PGE₂ disminuyó (-61%) • RANKL a 60 Hz (-55%) • MLO-Y4 con LHMf liberaron FS • Reducción de RAW264.7 positiva para TRAP (-36%) vs control
Li et al. (2012)	20 min cada 12, 24, 36 y 48 horas	Ensayo MTT y ELISA	ANOVA, Tukey, p < 0.05	Proliferación de OB, No y PGE ₂	<ul style="list-style-type: none"> • El MC de MLO-Y4 con LIPUS sin cambios en crecimiento MC3T3-e1, e inhibió la proliferación celular • ALP aumentó su actividad 30% • MLO-Y4 continuó secretando NO y PGE₂ vs control
Uzer (2014)	30 min	Citometría de flujo RT-PCR y Western Blot	ANOVA, Newman-Keuls, Spearman Rank, p < 0.05	Cx43, Akt	<ul style="list-style-type: none"> • El núcleo mostró cambios a 30 Hz siendo mayor 27%, que a 100 Hz • La GJIC aumentó 25%, dependiendo de la proteína AKT sin estar asociada con Cx43, ya que permaneció sin cambios después de la vibración vs control
Wu et al. (2016)	1 hora	ELISA, RT-PCR Citometría de flujo	ANOVA, Tukey, p < 0.05	Membrana Actina, NO, PGE ₂ , MC ALP, Ca ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> • 30 Hz en la membrana provocó una pequeña deformación • 90 Hz cambios en la morfología y los núcleos • La F-actina mostró estructura diferente alrededor del núcleo • Aumento de NO, PGE₂, Ca²⁺ y mejoró la osteogénesis vs control
Hao et al. (2017)	10 min, 30 min, 1, 3 o 6 horas	– Western Blot RT-PCR Ensayos de proliferación celular	ANOVA, Tukey, p < 0.05	IL-6, JAK, STAT3 y ERK	<ul style="list-style-type: none"> • IL-6 aumentó la expresión de Runx2, ALP, OCN, RANKL y OPG p < 0.001 inhibiendo el desarrollo de OC • Jak, STAT3 y ERK se encargan de la diferenciación de OB y OC • Al aplicar un anticuerpo que bloquea IL-6, aumentó la actividad de estas células vs control
Sakamoto et al. (2019)	1 min cada 12, 24 y 48 horas	– Western Blot RT-PCR Inmunofluorescencia	t Student, ANOVA, Tukey, p < 0.01 y 0.02	NF-κB RANKL	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos en RAW264.7 mostraron aumento en la proliferación celular sin afectar la diferenciación • En MLO-Y4 activó y elevó la fosforilación de IκB • El movimiento dental experimental RANKL y OPG elevó a NF-κB y RANKL en los osteocitos del lado de compresión del hueso alveolar <i>in vivo</i>; mejoró la osteoclastogénesis vs control

ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ANOVA = ANalysis Of VAriance, PGE₂ = prostaglandina, RANKL = Factor de transcripción Kappa B ligando, OPG = osteoprotegerina, COX-2 = enzima ciclooxigenasa-2, MLO-Y4 ANOVA = ANalysis Of VAriance Murine Long bone Osteocyte-Y4, LHMf = Low-magnitude, high-frequency, FS = Folliculostellate, MTT = (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide); ensayo colorimétrico para evaluar la actividad metabólica celular, OB = osteoblast, MC = medio condicionado, ALP = alkaline phosphatase factor de crecimiento del tejido conectivo, NO = óxido nítrico, GJIC = comunicación intercelular de unión de brecha.

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

Autor	Tiempo de vibración	Prueba de laboratorio	Análisis estadístico	Factores solubles que se evaluaron	Resultados del grupo control en comparación con el experimental
Lau et al. (2011)	1 hora por 6 días	RT-PCR Ensayo de proliferación celular Citometría de flujo	t de Student, $p < 0.05$	ALP Runx2 Osterix COL1A1 OPN BSP	<ul style="list-style-type: none"> La proliferación de MSC y expresión de ALP en ambos grupos por 14 días no se encontraron diferencias Osx, ALP, COL1A1, OPN y BSP para día 6 fueron más altos ($p < 0.01$) Cultivos LMHF contenían una cantidad menor de mineralización de matriz normalizada del (-24%)
Wu S et al. (2012)	15 min al día	RT-PCR Western Blot	ANOVA, Dunnett, $p < 0.05$	RANKL F-Actina C-fos	<ul style="list-style-type: none"> MNC control positivas para TRAP contenían (3 núcleos) Tratadas con RANKL aumentaron 70 veces (10 núcleos) LMHFV mostró disminución $p < 0.01$, inhibió los anillos de actina interrumpiendo la organización citoesquelética Catepsina K, MMP-9 y TRAP reducción $p < 0.001$, C-fos $p < 0.05$
Maredziak et al. (2017)	10 min durante 21 días	ELISA RT-PCR Citometría de flujo	ANOVA, Dunnett, $p < 0.05$	BMP-2, OCL y OPN	<ul style="list-style-type: none"> En la diferenciación osteogénica las células a 25 Hz mostraron mayor proliferación, el tiempo de duplicación de la población fue menor ($p < 0.01$), aumentó de nódulos osteogénicos creados por ME rica en hidroxiapatita ALP, BMP₂, OCN, OPN e integrinas su mayor actividad fue a los 21 días en todas las frecuencias vs control
Judex, & Pongkitwitoon (2018)	20 min y 5 min	RT-PCR	Fisher, $p < 0.05$	COLA1 ALPL RUNX2 FGF2 P13K, RANK NAFATCI	<ul style="list-style-type: none"> Ambos dispositivos aumentaron $p < 0.5$ la proliferación celular de osteoblastos y fibroblastos, siendo VPro5 mayor ($p < 0.05$) Aumento de osteoclasto moderado COLA1, ALPL y Runx2 se elevaron $p < 0.5$ por parte de VPro5 FGF2 y CTGF aumentaron 30 y 40%. P13K, RANK Y NAFATCI sin cambios
García et al. (2020)	20 min	Citometría de flujo Ensayo de caspasa 3/7	U de Mann-Whitney, $p < 0.05$	IL-4, IL-13, IL-17, OPG, RANKL y TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> La síntesis de IL- 4,13,17, OPG y TGF-β observó aumento y mostró disminución de sRANKL PNCA incrementó significativamente Caspasa 3/7 mostró un alza positiva

RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction, ALPL = fosfatasa alcalina biominerizada asociada, RUNX2 = factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), OPN = osteopontina, BSP = bone sialoprotein, ANOVA = ANalysis Of VAriance, RANKL = Factor de transcripción Kappa B ligando, MNL = Mononuclear leukocytes, TRAP = Tartrate-resistant acid phosphatase, LMH FV = Leghorn male hepatoma, ELISA = Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, BMP-2 = bone morphogenetic protein 2, OCL = Osteoclast-like cells, OCN = Osteocalcin, FGF 2 = Fibroblast growth factor 2, CTGF = Connective tissue growth factor.

mejorar la diferenciación de osteoblastos, genes de expresión y proteínas para inducir osteogénesis.

Se suma un estudio realizado por Wu, el cual determinó que la microvibración afectó las funciones de los osteoclastos, en tanto se presentó una reducción significativa para la formación de células multinucleadas (MNC) positivas a la fosfatasa ácida resistente al tartrato (+TRAP) inducidas por RANKL. Adicionalmente, disminuyeron los anillos de actina y hubo una sobreexpresión de la expresión de catepsina K (CatK), MMP-9, enzimas responsables de la degradación del mineral óseo y las matrices de colágeno, por los osteoclastos.^{29,30} Por el contrario, Sakamoto, en 2019, presentó un aumento en la proliferación de una línea celular de preosteoclastos RAW246.7 al estimularla con microvibración por 1 minuto a 48.3 Hz, mientras que, por otra parte, en las células de la línea celular de osteocitos MLO-Y4 aumentó la expresión de RANKL, sin afectar la relación de ARNm de osteoprotegerinas (OPG). No obstante, en el modelo *in vivo*, mostraron que los osteocitos del lado compresivo del hueso alveolar aumentaron la expresión de RANKL, en tanto que en el lado de tensión no presentó diferencia de expresión de RANKL.³¹ En los dos estudios mencionados, la microvibración sobre los osteoclastos pareció tener un efecto antirresortivo, por lo que inhibió la formación de osteoclastos en los modelos *in vitro*.

Esto demuestra que los osteocitos son mecanosensibles capaces de enviar señalamientos en las células vecinas como osteoblastos, osteoclastos y fibroblastos en forma paracrina y autocrina, ya que la comunicación intercelular de unión de brecha (GJIC) es importante durante la mecanotransducción celular, la cual aumenta la GJIC entre células óseas. Los osteocitos que se encuentran dentro de la matriz ósea utilizan el GJIC de manera efectiva para inducir respuestas derivadas de la estimulación mecánica, por lo que la microvibración incrementó significativamente los GJIC.³²

Por otro lado, se ha señalado que la microvibración puede tener diferentes efectos sobre los osteocitos a diferentes intensidades. En otro estudio donde se aplicó estimulación mecánica; no se observaron cambios significativos en la membrana celular y núcleo de los osteocitos. No obstante, la secreción de algunos marcadores de los osteocitos se vio alterada, como fue el óxido nítrico (NO) que incrementó a 30 Hz; mientras que el Ca^{2+} no se vio alterado en esa intensidad, pero sí a 90Hz. Para PGE_2 , el aumento fue notable en todas las frecuencias, de igual manera que para la expresión de los genes de osteoblastos como la osteopontina (OPN), la osteocalcina (OC) y el propéptido de procólágeno tipo 1 (PINP); por

lo cual se deduce que el efecto de los osteocitos con microvibración podría tener un efecto sobre los osteoblastos dependiendo de la frecuencia, ya que podría inhibir o inducir la osteogénesis.³³

La remodelación del citoesqueleto podría ser crucial en la mecanotransducción, en tanto que la microvibración regula positivamente los genes de actina en osteocitos. Un acoplamiento entre el núcleo y el citoesqueleto es indispensable para amplificar la mecanorrespuesta y promover aún más la señalización celular.¹⁶

La supresión de la osteoclastogénesis por citocinas funciona como un sistema de inhibición que limita la resorción ósea y el daño tisular. Estos factores pueden suprimir la diferenciación de los precursores de osteoclastos, inhibiéndolos o indirectamente regulando la diferenciación y expresión de RANKL y OPG.¹⁰

Por otro lado, indican que la interleucina IL-6 es una citocina sensible a la estimulación por la carga mecánica, la cual regula la formación y resorción óseas. Los osteocitos regulan la respuesta osteogénica y la actividad de los osteoclastos bajo carga mecánica mediada por la producción de IL-6 a través de las vías de señalización STAT3 y ERK.⁶ Además, se ha demostrado que la IL-4 regula la homeostasis ósea al inhibir la función de los osteoclastos maduros e interferir con la señalización NF- κ B y Ca^{2+} , la cual suprime la expresión de RANK en células precursoras osteoclasticas. Sin embargo, la IL-13 aumenta la expresión de OPG en osteoblastos en conjunto con la IL-4. El antígeno nuclear de células en proliferación (PNCA) mejora esta actividad en respuesta a estímulos externos. TGF- β puede inhibir la apoptosis de los osteoblastos manteniendo su supervivencia durante la transdiferenciación en osteocitos. La IL-17 regula el alza de la expresión de catepsina K y MMP-9. García y su grupo mostraron un aumento en la síntesis de IL-4, IL-13, IL-17, OPG, TGF- β , PNCA y caspasa 3/7, así como una disminución de sRANKL en cultivos de osteoblastos y osteoclastos estimulados con microvibración a 30 Hz.¹

En otro estudio en el que se compararon dos dispositivos de ortodoncia que generan microvibraciones a diferentes intensidades (VPro5 120 Hz y AcceleDent 30 Hz), cuyo propósito es acelerar el movimiento de los dientes durante el tratamiento de ortodoncia, mostró que en cultivos de osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos humanos, se presentó una mayor proliferación celular y expresión génica de marcadores COLA1, fosfatasa alcalina biomineralizada asociada (ALPL), Runx2, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), además de factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) con el dispositivo VPro5. Estos datos sugieren que las microvibraciones promueven la

proliferación y diferenciación celular, mejoran el recambio tisular y, quizá, la aceleración del movimiento dental.³⁴ A la fecha no se ha podido demostrar a nivel celular y molecular, cómo la microvibración puede acelerar el movimiento de ortodoncia. Entonces, la estimulación por microvibración podría ser una terapia innovadora que podría tener efectos positivos en el desarrollo y formación del tejido óseo.³⁵

CONCLUSIÓN

La microvibración parece influir en la remodelación y regeneración ósea. La capacidad de mecanotransducción y mecanosensora de los osteocitos para responder a los estímulos mecánicos presumiblemente regula factores solubles al tener un efecto sobre las demás células óseas en la diferenciación y proliferación osteogénica e inhibición de la osteoclastogénesis. Ésta podría ser una terapia innovadora, no invasiva y no farmacológica prometedora en la regeneración de la superficie del hueso.

AGRADECIMIENTOS

El estudio se llevó a cabo con el apoyo de la Universidad Autónoma Metropolitana con la suma de la colaboración y financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 1014934).

REFERENCIAS

- García-López S, Villanueva RE, Massó-Rojas F, Páez-Arenas A, Meikle MC. Micro-vibrations at 30?Hz on bone cells cultivated *in vitro* produce soluble factors for osteoclast inhibition and osteoblast activity. *Arch Oral Biol.* 2020; 110: 104594. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104594.
- Kitaura H, Marahleh A, Ohori F et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (14): 5169. doi: 10.3390/ijms21145169
- Wang Z, Weng Y, Ishihara Y et al. Loading history changes the morphology and compressive force-induced expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin in MLO-Y4 osteocytes. *Peer J.* 2020; 8: e10244. doi: 10.7717/peerj.10244.
- Thompson WR, Uzer G, Brobst KE et al. Osteocyte specific responses to soluble and mechanical stimuli in a stem cell derived culture model. *Sci Rep.* 2015; 5: 11049. doi: 10.1038/srep11049.
- Moriishi T, Fukuyama R, Ito M et al. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. *PLoS One.* 2012; 7 (6): e40143. doi: 10.1371/journal.pone.0040143.
- Hao Z, Ma Y, Wu J et al. Osteocytes regulate osteoblast differentiation and osteoclast activity through Interleukin-6 under mechanical loading. *RSC Advances.* 2017; 7 (79): 1-10. doi: 10.1039/C7RA09308J.
- Pathak JL, Bravenboer N, Klein-Nulend J. El osteocito como el nuevo descubrimiento de opciones terapéuticas en enfermedades óseas

- raras. *Endocrinol frontal (Lausana).* 2020; 11: 405. doi: 10.3389/fendo.2020.00405.
- Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res.* 2018; 59 (2): 99-107. doi: 10.1080/03008207.2017.1290085.
- Zhang Q, Chen B, Yan F et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 1-5. doi: 10.1155/2014/284836.
- Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther.* 2011; 13 (4): 234. doi: 10.1186/ar3379.
- García-López S, Villanueva R, Meikle MC. Alterations in the Synthesis of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and their downstream targets RANKL and OPG by mouse calvarial osteoblasts *in vitro*: inhibition of bone resorption by cyclic mechanical strain. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 160. doi: 10.3389/fendo.2013.00160.
- Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473 (2): 139-146. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.018.
- Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec.* 1987; 219 (1): 1-9. doi: 10.1002/ar.1092190104.
- Haffner-Luntzer M, Liedert A, Ignatius A. Mechanobiology of bone remodeling and fracture healing in the aged organism. *Innov Surg Sci.* 2016; 1 (2): 57-63. doi: 10.1515/iss-2016-0021.
- Lau E, Al-Dujaili S, Guenther A, Liu D, Wang L, You L. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. *Bone.* 2010; 46 (6): 1508-1515. doi: 10.1016/j.bone.2010.02.031.
- Steppe L, Liedert A, Ignatius A, Haffner-Luntzer M. Influence of low-magnitude high-frequency vibration on bone cells and bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8: 595139. doi: 10.3389/fbioe.2020.595139.
- Santos CMC, Pimenta CAM, Nobre MRC. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. *Rev Lat Am Enfermagem.* 2007; 15 (3): 508-511. doi: 10.1590/s0104-11692007000300023.
- Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021; 372: n71. doi: 10.1136/bmj.n71.
- Jadad AR, Moore RA, Carroll D et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: Is blinding necessary? *Contr Clin Trials.* 1996; 17 (1): 1-12. doi: 10.1016/0197-2456(95)00134-4.
- Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page M, Welch V. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions version 6.0 (Actualized in July 2019); Available in: https://training.cochrane.org/handbook/current*
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95 (7): 1-6. doi: 10.1073/pnas.95.7.3597.
- Lacey DL, Timms E, Tan H et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93(2):1-12. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x.
- Lau E, Lee WD, Li J et al. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteogenic differentiation of rat mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res.* 2011; 29 (7): 1-14. doi: 10.1002/jor.21334.
- Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. *Development.* 2015; 142 (6): 1-5. doi: 10.1242/dev.102210
- Mareczak M, Lewandowski D, Tomaszewski KA, Kubiak K, Marycz K. The effect of low-magnitude low-frequency vibrations (LMLF)

- on osteogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. *Cell Mol Bioeng*. 2017; 10 (6): 549-562. doi: 10.1007/s12195-017-0501-z.
26. Marycz K, Lewandowski D, Tomaszewski KA, Henry BM, Golec EB, Marzdzia M. Low-frequency, low-magnitude vibrations (LFLM) enhances chondrogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). *PeerJ*. 2016; 4:1-25. doi: 10.7717/peerj.1637.
 27. Li L, Yang Z, Zhang H, Chen W, Chen M, Zhu Z. Low-intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of osteoblasts through osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 418 (2): 296-300. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.014.
 28. Spadaro JA, Albanese SA. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound Med Biol*. 1998; 24 (4): 567-573. doi: 10.1016/s0301-5629(98)00006-4.
 29. Wu SH, Zhong ZM, Chen JT. Low-magnitude high-frequency vibration inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *Int J Med Sci*. 2012; 9 (9): 801-807. doi: 10.7150/ijms.4838.
 30. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423 (6937): 337-342. doi: 10.1038/nature01658.
 31. Sakamoto M, Fukunaga T, Sasaki K et al. Vibration enhances osteoclastogenesis by inducing RANKL expression via NF- κ B signaling in osteocytes. *Bone*. 2019; 123: 56-66. doi: 10.1016/j.bone.2019.03.024.
 32. Uzer G, Pongkitwitoon S, Ian C et al. Gap junctional communication in osteocytes is amplified by low intensity vibrations *in vitro*. *Plos One*. 2014; 9 (3): 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0090840.
 33. Wu XT, Sun LW, Qi HY, Shi H, Fan YB. The bio-response of osteocytes and its regulation on osteoblasts under vibration. *Cell Biol Int*. 2016; 40 (4): 397-406. doi: 10.1002/cbin.10575.
 34. Judex S, Pongkitwitoon S. Differential Efficacy of 2 Vibrating Orthodontic Devices to Alter the Cellular Response in Osteoblasts, Fibroblasts, and Osteoclasts. *Dose Response*. 2018; 16 (3): 1-8. doi: 10.1177/1559325818792112.
 35. García-López S, Villanueva R, Pérez JL, Juárez LI, Páez-Arenas A, Massó LF, Meikle MC. Effects of micro-vibration at 30 Hz on IL-17 and RANKL expression *in vitro* mouse skull-derived osteoblasts and bone marrow-derived osteoclasts. *Rev Mex Ortodon*. 2019; 7 (1): 24-32.

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Aspectos éticos: Ninguno.

Financiamiento: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. 1014934).

Correspondencia:

Dr. Salvador García-López

E-mail: salvador.garcia@universidad-uic.edu.mx