



Efectos de la microvibración a 30 Hz sobre la expresión de IL-17 y RANKL en células osteoblásticas derivadas del cráneo y osteoclastos derivados de la médula ósea cultivadas *in vitro*

Salvador García López,* Rosina E Villanueva Arriaga,[§] José Luis Pérez Vázquez,^{||} Luis Iván Juárez Noriega,^{||} Aracely Paéz Arenas,[¶] Luis Felipe Massó,[¶] Murray C Meikle**

* Profesor Titular de Ortodoncia, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México. Catedrático en Ortodoncia. Postgrado de Ortodoncia, Universidad Intercontinental, Ciudad de México. Profesor Honorario de Ortodoncia, Postgrado de Ortodoncia, Hospital General «Dr. Manuel Gea González». UNAM. Ciudad de México. Práctica privada.

[§] Coordinadora de la Licenciatura de Estomatología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Ciudad de México.

^{||} Egresado de Estomatología. Universidad Autónoma Metropolitana-Campus Xochimilco, Ciudad de México.

[¶] Departamento de Fisiología, Unidad de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez», Ciudad de México.

** Profesor Emérito del *King's College, Dental Institute, at Guy's, King's and St. Thomas's Hospital, University of London, United Kingdom.*

RESUMEN

Introducción: Se ha demostrado que utilizar el tratamiento de microvibración en pacientes con osteoporosis induce remodelación en la cortical externa del esqueleto, quizá debido a la inhibición de la actividad osteoclástica. **Objetivo:** Evaluar los efectos de la microvibración durante 20 minutos a 30 Hz en células osteoblásticas y osteoclastos para determinar la expresión de IL-17 y RANKL. **Material y métodos:** Osteoblastos derivados del cráneo del ratón Balb/C fueron sembrados en cajas de 24 pozos de 1.5 cm (Gybco, EUA) en un medio de cultivo DMEM F-12 (ATCC, EUA) y osteoclastos derivados de células madre de la tibia de ratón fueron sembrados en cajas de 24 pozos de 1.5 cm en un medio de cultivo α -MEM (ATCC, EUA), adicionando 0.5 μ L/mL de $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina D_3 (Sigma-Aldrich, EUA). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (Gybco, EUA), 1% de antibióticos y antimicóticos, en una incubadora de tejidos (NuAire, EUA) a una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, las células cultivadas se sometieron a microvibraciones (0.25 N; 30 Hz) con el aparato AcceleDent (Ortho Accel, EUA) durante 20 minutos. Antes y después de las microvibraciones se recolectaron 500 μ L de sobrenadante de las células, el cual fue almacenado en un ultracongelador a -70 °C (Thermo, EUA) para posteriormente determinar la expresión de IL-17 y RANKL (Pepro- tech, Rocky Hill, NJ, EUA) por medio del ensayo de ELISA. **Resultados:** La microvibración mostró una sobrerregulación estadísticamente significativa en la alteración de IL-17 tanto en los cultivos de osteoblastos como el de los osteoclastos comparada con el grupo control. Sin embargo, en los osteoclastos y osteoblastos hubo una bajorregulación estadísticamente significativa de la expresión de RANKL comparada con el grupo control. **Conclusión:** El estudio demostró que tanto osteoblastos como osteoclastos cultivados *in vitro* sometidos a microvibración de 30 Hz durante 20 minutos producen factores solubles relacionados con la maduración e inhibición osteoclástica.

Palabras clave: Osteoclastos, osteoblastos, IL-17, RANKL, remodelación ósea, microvibración, AcceleDent.

INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido dinámico que se forma y se reabsorbe continuamente bajo la regulación de las hormonas osteotrópicas como: la hormona paratiroidea, la hidroxivitamina D_3 , la hormona del crecimiento y de la carga mecánica la cual es evidente durante la actividad física, el ejercicio y la presión atmosférica. Esta mecanosensibilidad ósea puede inducir remodelación siempre que sea una carga fisiológica o pérdida ósea cuando la carga es excesiva. El estímulo mecánico juega un papel importante durante el crecimiento, estructura y mantenimiento del esqueleto.^{1,2}

Debido a que la estimulación mecánica fisiológica puede inducir remodelación ósea, se han desarrollado tecnologías basadas en la estimulación mecánica a través de la microvibración.³ Normalmente, ésta es de baja magnitud y alta frecuencia y puede ir de los 10 a 100 Hz y una magnitud de 0.3 g de aceleración, la cual ha demostrado reparar y regenerar el sistema musculoesquelético.^{4,5} Estudios previos *in vitro* han demostrado que la microvibración en osteocitos,

Recibido: Mayo 2018. Aceptado: Octubre 2018.

© 2019 Universidad Nacional Autónoma de México, [Facultad de Odontología]. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Este artículo puede ser consultado en versión completa en <http://www.medigraphic.com/ortodoncia>

osteoblastos y sus precursores puede sobreregular la expresión proinflamatoria y antiinflamatoria de citocinas que conllevan la remodelación ósea.⁶⁻⁸ La aplicación de la microvibración en ovejas durante 20 minutos durante un año mostró que el hueso trabecular incrementó tanto en cantidad como en calidad.⁹ Esta misma situación fue evidente también en un estudio de ratones.¹⁰ A su vez, resultados obtenidos en mujeres postmenopáusicas a quienes se les aplicó una terapia de microvibración en todo el cuerpo de 20-90 Hz por un año demostraron el incremento en la densidad ósea mineral.¹¹

Por otra parte, estudios realizados en hueso alveolar en los que se aplicaron 60 Hz y 0.3 g por cinco minutos mostraron un incremento del volumen y densidad del hueso, además de una sobreexpresión de proteínas osteogénicas.¹² A su vez, la aplicación de microvibración a 30 Hz, 1 CN durante 15 minutos por siete días, en molares de rata que fueron sometidos al movimiento dentario ortodóncico, mostró un incremento en volumen del tejido, reparación del ligamento periodontal y reducción del número de osteoclastos.¹³ Utilizar la microvibración a 30 Hz ha sido propuesto durante el movimiento de ortodoncia con el propósito de acelerarlo, aunque a la fecha se desconoce el mecanismo a nivel celular y molecular por el cual se podría lograr dicho evento. Al considerar lo anterior, el propósito de este trabajo fue evaluar los efectos de la microvibración durante 20 minutos a 30 Hz en células osteoblásticas y osteoclasticas para poder entender y determinar si a través de la microvibración se puede alterar la expresión de IL-17 y RANKL, citocinas relacionadas con la remodelación ósea, por medio del ensayo de ELISA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Osteoblastos derivados del cráneo de ratón recién nacido de la cepa Balb/c

Los osteoblastos derivados del cráneo del ratón recién nacido de la cepa Balb/c fueron preparados y caracterizados del método previamente descrito por Heath y col.¹⁴ Los osteoblastos fueron obtenidos por medio de digestión enzimática con 1 mg/mL de tripsina durante 20 minutos del tejido óseo obtenido del cráneo del ratón. Las células desprendidas fueron colocadas en un tubo Falcon y centrifugadas a 1000 rpm durante cinco minutos. El botón de células obtenido fue resuspendido en 1:1 F12-DMEM (ATCC, EUA), suplementado con 20% de suero fetal (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin, los cuales fueron

sembrados en cajas de 24 pozos de 1.5 cm (GIBCO, EUA) en una incubadora de tejidos (NuAire, EUA) a una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire a una temperatura de 37 °C hasta alcanzar la confluencia de las células.

Osteoclastos derivados de células madre de la tibia de ratón recién nacido de la cepa Balb/c

Los osteoclastos fueron diferenciados de células madre de la tibia de ratón, los cuales fueron sembrados en cajas de 24 pozos de 1.5 cm en un medio de cultivo α -MEM (ATCC, EUA) adicionando 0.5 µL/mL de 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ (Sigma-Aldrich, EUA). El medio de cultivo fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gybc, EUA), 1% de antibióticos y antimicóticos, en una incubadora de tejidos (NuAire, EUA) a una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire a una temperatura de 37 °C.

Las células madre derivadas en osteoclastos fueron preparados conforme al método previamente descrito por Tumber y col.,¹⁵ con una ligera modificación. Las células madre fueron obtenidas de la tibia del ratón recién nacido de la cepa BALB/C, después de remover todo el tejido adherente sobre la tibia. Fueron cortadas con un bisturí en cajas Petri de 30 mm con medio de cultivo α -MEM (*In vitro*, Ciudad de México, México). Las células obtenidas fueron aspiradas y colocadas en un tubo Falcon de 12 mm y centrifugadas a 1000 rpm durante cinco minutos; posteriormente, las células fueron resuspendidas y sembradas a una densidad 1 × 10⁶ en cajas de 24 pozos de 1.5 cm y cultivadas en un medio α -MEM, suplementado con 10% de suero fetal de ternera (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 50 ng/mL de M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA) y 100 ng/mL de RANKL (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EUA), en una incubadora de Tejidos (NuAire, EUA) a 37 °C, en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Después de dos semanas de cultivo, se realizó la prueba de resistencia al tartrato (TRAP+) en las células cultivadas con el propósito de corroborar la diferenciación de estas células en osteoclastos.

Estimulación de los osteoblastos y osteoclastos con la microvibración

Ambos tipos de células se sometieron a microvibraciones (0.25 N; 30 Hz) en las cajas de cultivo de 1.5 cm utilizando el aparato AcceleDent (Ortho Accel, EUA) durante 20 minutos. Antes y después de las

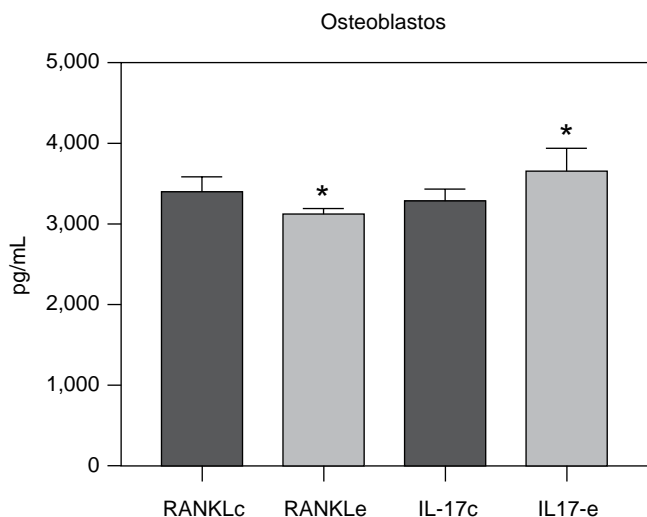


Figura 1: Los resultados demostraron que el grupo experimental presentó significativamente una sobrerregulación de IL-17 ($3,443 \pm 26.38$), comparada con el grupo control ($3,262 \pm 59.92$), $*p < 0.01$. El RANKL en el grupo experimental presentó significativamente una bajorregulación ($3,097 \pm 26.38$), comparada con el grupo control ($3,376 \pm 59.92$), $*p < 0.01$. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM para cinco cultivos.

*The experimental group showed a significant upregulation of IL-17 ($3,443 \pm 26.38$) compared with the control group ($3,262 \pm 59.92$), $*p < 0.01$, and a significant downregulation of RANKL ($3,097 \pm 26.38$) compared with the control group ($3,376 \pm 59.92$), $*p < 0.01$. The results are presented as the mean \pm SEM for 5 cultures.*

microvibraciones se recolectaron 500 μ L de sobrenadante de las células y almacenado en un ultracongelador a -70 °C (Thermo, EUA) para posteriormente realizar el ensayo por medio de ELISA y determinar la expresión de IL-7 y RANKL (Peprotech, Rocky Hill, NJ., EUA).

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Consiste en una técnica de inmunoensayo en la que se colocó en una placa de 96 pozos un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que, a su vez, es reconocido por un anticuerpo secundario. La aparición de colorante sobre los pozos de la placa permite medir indirectamente mediante la espectrofotometría el antígeno en la muestra.

Brevemente se realiza lo siguiente: se prepararon los reactivos para cada una de las citocinas a evaluar por separado de acuerdo con las instrucciones del fabricante de IL-17 y RANKL (Peprotech Inc., EUA). Se preparó la placa de 96 pozos, que consistió en diluir

el anticuerpo de captura en PBS a una concentración de 1 μ g/mL; inmediatamente, se adicionaron 100 μ L a cada uno de los pozos de la placa; se selló la placa con una cubierta adhesiva y se incubó por una noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se aspiró el contenido de los pozos y se lavó cuatro veces con 100 μ L de solución buffer. En la última lavada de los pozos, se tomó la placa y se golpeó suavemente contra una toalla de papel para eliminar cualquier burbuja que haya quedado dentro de los pozos. Se adicionaron 300 μ L del buffer de bloqueo a cada pozo y se incubó la placa por una hora a temperatura ambiente. Se aspiraron y se lavaron cuatro veces los pozos con solución buffer.

Protocolo de ELISA

Preparación del estándar y de la muestra

Se diluyó el estándar desde 2 μ g hasta 0 en diluyente; se colocaron 100 μ L del estándar en los pozos para la curva y de la muestra a estudiar en cada pozo en duplicado. La placa se incubó por dos horas a temperatura ambiente.

Preparación del anticuerpo de detección

La placa se lavó cuatro veces con solución buffer. Se diluyó el anticuerpo de detección en diluyente a una concentración de 1 μ g/mL. Se adicionaron 100 μ L a cada pozo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante dos horas.

Preparación de la peroxidasa avidina

La placa se aspiró y lavó cuatro veces. Se diluyó una alícuota de 5.5 μ L de peroxidasa avidina 1:2000 en diluyente para un volumen total de 11 mL. Se adicionaron 100 μ L por pozo y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

Solución de sustrato líquido ABTS

El sustrato ABTS se colocó al medio ambiente antes de utilizarlo. Se aspiró y se lavó cuatro veces la placa. Se adicionaron 100 μ L de la solución de sustrato a cada pozo; la placa se incubó a temperatura ambiente y fue monitoreada cada cinco minutos hasta que se desarrolló el color en los pozos para posteriormente poner la placa en el lector de ELISA a 450 nm (Labsystems Multiskan MS, Finlandia) y obtener los resultados para el correspondiente análisis estadístico.

Consideraciones éticas

La manipulación de los animales para este estudio se hizo con base en las consideraciones éticas del Manual de Procedimientos de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio UPEAL-BIOTERIO, el cual se estructuró de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, además de estar aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Análisis estadístico

Los datos son expresados como el promedio \pm SEM. La diferencia entre los grupos control y experimental fueron determinados por la prueba estadística de U de Mann-Whitney, utilizando el *software* Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, EUA). El nivel de significancia fue establecido en $p < 0.05$.

RESULTADOS

Monocapas de osteoblastos derivados del cráneo de ratón de la cepa Balb/c cultivados *in vitro* fueron sometidos a microvibración de baja magnitud a alta frecuencia durante 20 minutos. El sobrenadante fue ensayado para IL-17 y RANKL por medio de ELISA.

Monocapas de osteoclastos derivados de células madre de la tibia de ratón de la cepa Balb/c cultivados *in vitro* fueron sometidos a microvibración de baja magnitud a alta frecuencia a 30 Hz durante 20 minutos. El sobrenadante fue ensayado para IL-17 y RANKL por medio de ELISA (Figuras 1 y 2).

DISCUSIÓN

Este estudio evaluó los efectos de la microvibración a una magnitud de 0.25 N y una frecuencia de 30 Hz durante 20 minutos utilizando el aparato AcceleDent en cultivos primarios de osteoblastos derivados del cráneo de ratón y en osteoclastos derivados de células madre de la médula ósea para determinar eventos sobre la alteración de la IL-17 y sRANKL, citocinas relacionadas con la actividad osteoclástica. Los resultados mostraron que tanto en cultivos de osteoblastos como de osteoclastos primarios la microvibración resultó en una sobrerregulación estadísticamente significativa de IL-17, comparada con el grupo control y una bajarregulación de sRANKL, también comparada con el grupo control. Se ha de-

mostrado que la IL-17 promueve diferenciación osteoclástica a través de la estimulación de IL-1 y del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y de la expresión del receptor de transcripción nuclear de activación κ B (RANKL),^{16,17} producción de proteínas de matriz extracelular en los osteoblastos,¹⁸ además de inducir en las células humanas CD11b positivas a osteoclastos en ausencia de los osteoblastos, en presencia exógena de RANKL.¹⁹

Por otro lado, durante el curso de los experimentos con microvibración, tanto osteoblastos como osteoclastos mostraron una bajarregulación estadísticamente significativa en la expresión de sRANKL comparada con el grupo control ($p < 0.01$). Esta citocina también es expresada por linfocitos T, fibroblastos sinoviales, además de los osteoblastos y osteoclastos en respuesta a la 1,25-dihidroxitamina D₃, prostaglandina E (PGE), hormona paratiroidea (HPT) y citocinas como la IL-1, IL-6, IL-17 y TNF, que inducen a la resorción ósea *in vitro*.² La osteoclastogénesis está mediada por la presencia de monocitos que circulan a través de su receptor RANKr,

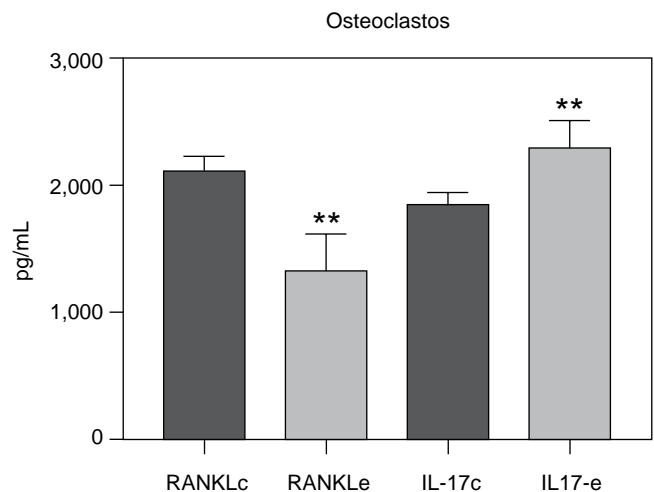


Figura 2: Los resultados demostraron que el grupo experimental presentó significativamente una bajarregulación de RANKL ($1,324 \pm 85.97$), comparada con el grupo control ($2,371 \pm 78.41$) $**p < 0.001$. La IL-17 en el grupo experimental presentó significativamente una sobrerregulación ($2,224 \pm 96.98$), comparada con el grupo control ($1,823 \pm 53.99$) $**p < 0.001$. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM para cinco cultivos.

*The experimental group showed a significant downregulation of RANKL ($1,324 \pm 85.97$) compared with the control group ($2,371 \pm 78.41$), $*p < 0.001$, and a significant upregulation of IL-17 ($2,224 \pm 96.98$) compared with the control group ($1,823 \pm 53.99$), $*p < 0.001$. The results are presented as the mean \pm SEM for 5 cultures.*

el cual recibe el ligando de RANKL expresado por los osteoblastos. Por lo tanto, estos monocitos se diferencian en osteoclastos a través de la activación de la proteína (AP)1, familia del factor nuclear de transcripción κ B.²⁰ Sin embargo, todo proceso requiere una homeostasis para controlar la resorción ósea, la cual es regulada por la osteoprotegerina (OPG), misma que se une e inhibe a RANKL para interrumpir la osteoclastogénesis. La OPG es expresada por osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos, entre otras células. Esta se incrementa con la presencia de 1,25-dihidroxivitamina D₃, TNF, 17-estradiol, IL-1, proteína morfogenética-2, el patrón de señalamiento de Wnt y el TGF- β , entre otros. Por otro lado, la OPG puede disminuir con la presencia de PGE2, factor de crecimiento similar a la insulina 1 y corticosteroides.^{21,22}

Aunque en este estudio no fue evaluada la expresión de OPG, se demostró que la microvibración a 30 Hz bajorreguló la expresión de RANKL significativamente, comparada con el grupo control tanto de osteoblastos como de osteoclastos. En un estudio previo que realizamos sobre la microvibración, demostramos que estimuló una sobreexpresión de la IL-4 e IL-13, por lo que ambas citocinas contribuyen a una sobreexpresión de OPG, lo que conlleva una bajorregulación de RANKL³ y, por lo tanto, la inhibición de la actividad osteoclástica. Además, la IL-17 también estimula la expresión de RANKL en cultivos de osteoblastos y de células madre derivadas en osteoclastos,²³ la cual es regulada por PGE2. Por otro lado, la IL-17 también conlleva la regulación de anhidrasa carbónica II, catepsina K y de MMP-9 en presencia de RANKL en conjunto con IL-1 β ,²⁴ eventos relacionados con la inhibición y maduración del osteoclasto para regular el proceso de la resorción ósea.

Tomando en consideración lo anterior, se puede decir que la microvibración a 30 Hz, induce factores relacionados con la inhibición osteoclástica *in vitro*, lo cual coincide con otros estudios realizados.^{25,26} De esta forma, su aplicación clínica podría ser limitada en el movimiento dentario durante el tratamiento de ortodoncia;²⁷ por lo tanto, se sugiere evaluar diferentes citocinas para poder comprender mejor que otros factores solubles están relacionados con la estimulación a través de la microvibración.

CONCLUSIÓN

La microvibración de 30 Hz durante 20 minutos aplicada a cultivos *in vitro* de células osteoblásticas y osteoclásticas produce factores solubles relacionados con la maduración e inhibición osteoclástica.

Original research

Effects of micro-vibration at 30 Hz on IL-17 and RANKL expression in *in vitro* mouse skull-derived osteoblasts and bone marrow-derived osteoclasts

Salvador García López,* Rosina E Villanueva Arriaga,[§] José Luis Pérez Vázquez,^{||} Luis Iván Juárez Noriega,^{||} Aracely Paéz Arenas,[¶] Luis Felipe Massó,[¶] Murray C Meikle**

* Profesor Titular de Ortodoncia, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México. Catedrático en Ortodoncia. Posgrado de Ortodoncia, Universidad Intercontinental, Ciudad de México. Profesor Honorario de Ortodoncia, Posgrado de Ortodoncia, Hospital General «Dr. Manuel Gea González». UNAM. Ciudad de México. Práctica privada.

§ Coordinadora de la Licenciatura de Estomatología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Ciudad de México.

|| Egresado de Estomatología. Universidad Autónoma Metropolitana-Campus Xochimilco, Ciudad de México.

¶ Departamento de Fisiología, Unidad de Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología «Ignacio Chávez», Ciudad de México.

** Profesor Emérito del King's College, Dental Institute, at Guy's, King's and St. Thomas's Hospital, University of London, United Kingdom.

ABSTRACT

Introduction: Micro-vibration therapy in patients with osteoporosis has been shown to induce remodeling in the outer cortical bone perhaps due to inhibition of the osteoclastic activity. **Objective:** We assessed the effects of exposure to micro-vibration for 20 minutes at 30 Hz in osteoblastic and osteoclastic cells to determine the expression of IL-17 and RANKL. **Material and methods:** Osteoblasts derived from the skull and osteoclasts derived from tibia stem cells of a Balb/c strain mouse were cultured in 24-well plates (Gybc, USA) in the following culture media, respectively: DMEM F-12 (ATCC, USA) and α -MEM (ATCC, USA), adding 0.5 μ L/mL of 1 α , 25-Dihydroxivitamin D₃ (Sigma-Aldrich, USA) to the latter. Both culture media were supplemented with 10% fetal bovine serum (Gybc, USA), 1% of antibiotics and antifungals. Incubation (NuAire, USA) was done in an atmosphere of 5% CO₂, 95% humidity at 37 °C. Cultured cells were subsequently subjected to micro-vibrations (0.25 N, 30 Hz) with AcceleDent (Ortho Accel, USA) for 20 minutes. Before and after exposure to the vibrations 500 μ L of supernatant of both cultured cells were collected and stored in an ultra-low temperature freezer at -70 °C (Thermo, USA) to later determine IL-17 and RANKL expression (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) by ELISA test. **Results:** Micro-vibration produced a statistically significant upregulation of IL-17 and downregulation of RANKL in both cultured osteoblasts and osteoclasts in the experimental group compared with the control group. **Conclusion:** Micro-vibration at 30 Hz for 20 minutes applied to *in vitro* cultures of osteoblastic and osteoclastic cells produces soluble factors related to osteoclastic maturation and inhibition.

Keywords: Osteoclasts, osteoblasts, IL-17, RANKL, bone remodeling, micro-vibration, AcceleDent.

INTRODUCTION

Bone is a dynamic tissue that is formed and reabsorbed continuously under the regulation of osteotropic hormones, such as the parathyroid hormone and 1,25 hydroxyvitamin D₃, the growth and mechanical load hormone (which is evident for physical activity, exercise, and atmospheric pressure). This bone mechano-responsiveness can induce redevelopment whenever there is bone loss or physiological load when the load is excessive. Mechanical stimulation plays an important role in the growth, structure and maintenance of the skeleton.^{1,2}

Because physiological mechanical stimulation can induce bone remodeling, technologies based on stimulation through micro-vibration have been developed.³ Micro-vibration is usually of low magnitude and high frequency and can range from 10 to 100 Hz and a magnitude of 0.3 g of acceleration, which has shown to repair and regenerate the musculoskeletal system.^{4,5} Previous studies have proved that micro-vibration performed on *in vitro* osteocytes, osteoblasts, and their precursors, upregulate the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines that lead to bone remodeling.⁶⁻⁸ The application of micro-vibration in sheep for 20 minutes for a year showed that the trabecular bone increased both in quantity and quality.⁹ The same was also evident in a study on mice.¹⁰ Likewise, results of micro-vibration therapy at 20-90 Hz for a year in postmenopausal women in all the body showed increased bone mineral density.¹¹

Furthermore, studies on alveolar bone in which micro-vibration at 60 Hz and 0.3 g for 5 minutes was applied showed an increase of bone volume and density, in addition to an overexpression of osteogenic proteins.¹² Also, the application of micro-vibration at 30 Hz, 1CN for 15 minutes for seven days in molars of rats that were subjected to orthodontic tooth movement resulted in an increased volume of tissue, repairing of periodontal ligament, and reduction in the number of osteoclasts.¹³ The use of micro-vibration at 30 Hz has been proposed during the teeth movement of orthodontics in order to accelerate it, though the cellular and molecular mechanism by which this can be achieved is yet unknown. Considering the above, the purpose of this work was to evaluate the effects of micro-vibration at 30 Hz for 20 minutes in osteoblastic and osteoclastic cells to understand and determine whether the expression of the cytokines IL-17 and RANKL-both related to bone remodeling-ascertained by ELISA test can be altered through micro-vibration.

MATERIAL AND METHODS

Osteoblasts derived from the skull of a newborn Balb/c strain mouse

Osteoblasts derived from the skull of a newborn mouse (Balb/c strain) were prepared and characterized by the method previously described by Heath et al.¹⁴ The osteoblasts were obtained from bone tissue of the mouse skull by enzymatic digestion with trypsin (1 mg/mL) for 20 minutes. Detached cells were placed in a Falcon tube and centrifuged at 1000 rpm for five minutes. The recovered cell pellet was resuspended in 1:1 F12-DMEM (ATCC, USA), supplemented with 20% of fetal serum (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 units/ml penicillin and 100 µg/mL streptomycin, and cultured in 24-well plates (GIBCO, USA) in a tissue incubator (NuAire, USA) at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ and 95% humidity up to cell confluence.

Osteoclasts derived from tibia stem cells of a newborn Balb/c strain mouse

Osteoclasts were differentiated from stem cells of the mouse tibia and cultured in 24-well plates, in α -MEM (ATCC, USA) culture medium adding 0.5 µL/mL of 1 α , 25-Dihydroxivitamin D₃ (Sigma-Aldrich, USA). The culture medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (GybcO, USA), 1% of antibiotics and antifungals. Incubation (NuAire, USA) was done at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity.

Osteoclasts-derived stem cells were prepared according to the method previously described by Tumber et al.¹⁵ with a slight modification. The stem cells were obtained from the tibia of the neonate Balb/c strain mouse after removing all soft tissue from the bone. Bone marrow was isolated and placed in 30-mm Petri dishes with α -MEM culture medium (*In vitro*, Mexico City, Mexico). The cells obtained were aspirated, placed in a 12-mm Falcon tube, and centrifuged at 1000 rpm for five minutes. Later the cells were resuspended and cultured adding 1 × 10⁶ cells per well in 24-well plates in α -MEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 50 ng/mL M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), and 100 ng/mL of RANKL (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Incubation (NuAire, USA) was done at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity. After two weeks of culture, the tartrate (TRAP +) resistance test was performed in grown cells to corroborate the differentiation of these cells into osteoclasts.

Stimulation of osteoblasts and osteoclasts by micro-vibration

Both types of cells were exposed to micro-vibrations (0.25 N, 30 Hz) in culture plates using AcceleDent (Ortho Accel, USA) for 20 minutes. Before and after micro-vibration, 500 μ L of supernatant was collected and stored in an ultra-low temperature freezer at -70 °C (Thermo, USA) to later testing by ELISA and to determine IL-7 and RANKL expression (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

We performed this immunoassay technique in a 96-well plate. The procedure is as follows: a primary antibody is added and binds to an antigen previously coated onto the wells; in a second stage, a secondary antibody with a marker binds to the primary antibody. The change of color of the marker after adding a substrate allows to measure indirectly by spectrophotometry the antigen in the sample.

Briefly, the reagents for each of the cytokines to be assessed were prepared separately according to the instructions of the IL-17 and RANKL manufacturer (Peprotech Inc., USA). The 96-well plate was prepared by diluting the captured antibody in PBS to a 1 μ g/mL concentration; next 100 μ L was added to each well and the plate was covered and incubated overnight at room temperature. The next day the contents of the wells were aspirated and washed 4 times with 100 μ L of buffer solution. After the last washing the plate was gently knocked against a paper towel to remove any bubbles remaining within the wells. 300 μ L of blocking buffer was added to each well and the plate was incubated for one hour at room temperature. The wells were aspirated and washed 4 times with buffer solution.

ELISA protocol

Preparation of the standard and the sample

The standard was diluted in diluent from 2 μ g to 0 μ g; 100 μ L of the standard preparation was added into the wells designated for the standard curve and 100 μ L of the sample for study was added into the wells designated for samples by duplicate. The plate was incubated for 2 hours at room temperature.

Preparation of the detection antibody

The plate was washed 4 times with buffer solution. The detection antibody was diluted in diluent at 1 μ g/

mL concentration. 100 μ L of diluted detection antibody was added to each well for incubation at room temperature for two hours.

Preparation of avidin peroxidase

The plate was aspirated and washed 4 times. A 5.5 μ L aliquot of Avidin Peroxidase 1:2000 was diluted in diluent for a total volume of 11 mL. 100 μ L was added per well and incubated for 30 minutes at room temperature.

ABTS liquid substrate solution

ABTS substrate was placed at room temperature before use. The plate was aspirated and washed 4 times. 100 μ L of substrate solution was added to each well; the plate was incubated at room temperature and monitored every 5 minutes until color developed in the wells. Subsequently, the plate was put in the ELISA reader at 450 nm (Labsystems Multiskan MS, Finland) to obtain the corresponding statistical analysis results.

Ethical issues

The manipulation of animals for this study followed the ethical considerations stated in the Guidelines of the UPEAL-BIOTERIO Unit of Laboratory Animal Production and Experimentation, which accord with the Official Mexican standards (NOM-062-ZOO-1999 and NOM-087-ECOL-SSA1-2002), in addition to being approved by the Ethics Committee of the Biological and Health Sciences Division at the Metropolitan Autonomous University (UAM) of Mexico.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm SEM. The differences between the control group and the experimental group were determined by Mann-Whitney U test, using the Graph Pad Prism 7 software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Monolayers of osteoblasts cultured *in vitro* derived from the skull of a Balb/c strain mouse were exposed to low magnitude, high frequency (30 Hz) micro-vibration for 20 minutes. The supernatant was assayed for IL-17 and RANKL by ELISA.

Monolayers of osteoclasts cultured *in vitro* derived from tibia stem cells of a Balb/c strain mouse were

exposed to low magnitude, high frequency (30 Hz) micro-vibration for 20 minutes. The supernatant was assayed for IL-17 and RANKL by ELISA (Figures 1 and 2).

DISCUSSION

This study evaluated the effects of micro-vibration at 30 Hz, 0.25 N for 20 minutes using the device AcceleDent in primary cultures of mouse skull-derived osteoblasts and bone marrow-derived osteoclasts to determine alteration in the expression of IL-17 and sRANKL. Both cytokines are related to osteoclastic activity. The results showed that in both osteoblasts and osteoclasts micro-vibration significantly upregulated IL-17 and downregulated sRANKL in the experimental compared with the control group. IL-17 has been shown to promote osteoclastic differentiation through stimulation of IL-1 and tumor necrosis factor (TNF- α), and through the expression of the nuclear factor- κ B (RANKL)^{16,17} and extracellular matrix protein production in osteoblasts,¹⁸ in addition to induce CD11b human cells positive to osteoclasts in the absence of osteoblasts and exogenous presence of RANKL.¹⁹

After exposure to micro-vibration both osteoblasts and osteoclasts showed a statistically significant downregulation in the expression of sRANKL for the experimental compared with the control group ($p < 0.01$). This cytokine is also expressed by lymphocytes T, synovial fibroblasts, and osteoblasts and osteoclasts in response to 1,25 dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E (PGE), parathyroid hormone (PTH), and cytokines such as IL-1, IL-6, IL-17 and TNF that induce *in vitro* bone resorption.² Osteoclastogenesis is mediated by the presence of monocytes circulating through their RANKr receptor, which receives the ligand of RANKL expressed by osteoblasts. Therefore, these monocytes differentiate into osteoclasts through activation of the (AP) 1 protein that is part of the nuclear factor- κ B family.²⁰ However, every process requires a homeostasis for controlling bone resorption, which is regulated by osteoprotegerin (OPG) that in turn binds and inhibits RANKL to interrupt osteoclastogenesis. OPG is expressed by osteoblasts, fibroblasts, and osteoclasts, among other cells. OPG increases with the presence of 1.25 dihydroxyvitamin D3, TNF, 17-estradiol, IL-1, bone morphogenetic-2 protein, Wnt signaling pattern, and TGF- β , among others. On the other hand, OPG may decrease with the presence of PGE2, a growth factor similar to insulin1 and corticosteroids.^{21,22}

Although the expression of OPG was not evaluated in this study, it was showed that micro-vibration at

30 Hz significantly downregulated the expression of RANKL in the experimental compared with the control group for both osteoblasts and osteoclasts. In a previous study, we demonstrated that micro-vibration stimulated an upregulation of IL-4 and IL-13, so both cytokines contribute to an upregulation of OPG, which leads to a downregulation of RANKL³ and thus to an inhibition of osteoclastic activity. In addition, IL-17 stimulates the expression of RANKL in cultured osteoblasts and stem cell-derived osteoclasts,²³ which is regulated by PGE2. On the other hand, IL-17 also involves the regulation of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and MMP-9 in the presence of RANKL together with IL-1 β ,²⁴ these events being related to the inhibition and maturation of the osteoclast to regulate the process of bone resorption.

Considering all the above, arguably micro-vibration at 30 Hz induces factors related to osteoclastic inhibition *in vitro*, which agrees with other studies.^{25,26} Therefore, its clinical application could be limited in tooth movement during orthodontics treatment,²⁷ so we suggest evaluating different cytokines to better understand that other soluble factors are associated with stimulation through micro-vibration.

CONCLUSION

Micro-vibration at 30 Hz for 20 minutes applied to *in vitro* cultures of osteoblastic and osteoclastic cells produces soluble factors related to osteoclastic maturation and inhibition.

REFERENCIAS / REFERENCES

- García-López S, Meikle MC, Villanueva RE, Montañón L, Massó F, Ramírez-Amador V et al. Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts *in vitro*. *Arch Oral Biol*. 2005; 50: 449-452.
- 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*. 2013; 4: 160. doi:10.3389/fendo.2013.00160.
- García-López S, Villanueva R, Juárez L, Pérez J. Evaluación de la microvibración en osteoblastos y osteoclastos cultivados *in vitro* sobre la producción de IL-4 e IL-13 con el uso del AcceleDent. *Ortodoncia Actual*. 2017; 13 (54): 42-45.
- Garman R, Gaudette G, Donahue LR, Rubin C, Judex S. Low level accelerations applied in the absence of weight bearing can enhance trabecular bone formation. *J Orthop Res*. 2007; 25 (6): 732-740.
- Xie L, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM et al. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone*. 2006; 39 (5): 1059-1066.
- Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech*. 2008; 41 (5): 1095-1103.

7. Tanaka SM, Li J, Duncan RL, Yokota H, Burr DB, Turner CH. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech.* 2003; 36 (1): 73-80.
8. Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech.* 2008; 41 (5): 1095-1103.
9. Rubin C, Turner AS, Müller R, Mittra E, McLeod K, Lin W, Qin Y. Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention. *J Bone Miner Res.* 2002; 17 (2): 349-357.
10. Xie L, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM et al. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone.* 2006; 39 (5): 1059-1066.
11. Rubin J, Murphy TC, Fan X, Goldschmidt M, Taylor WR. Activation of extracellular Signal-Regulated kinase is involved in mechanical strain inhibition of RANKL expression in bone stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2002; 17 (8): 1452-1460.
12. Alikhani M, Khoo E, Alyami B, Raptis M, Salgueiro JM, Oliveira SM et al. Osteogenic effect of high-frequency acceleration on alveolar bone. *J Dent Res.* 2012; 91 (4): 413-419.
13. Yadav S, Assefnia A, Gupta H, Vishwanath M, Kalajzic Z, Allareddy V et al. The effect of low-frequency mechanical vibration on retention in an orthodontic relapse model. *Eur J Orthod.* 2016; 38 (1): 44-50.
14. Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, Atkinson SJ, Reynolds JJ. Pig interleukin 1 (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption *in vitro*. *Calcif Tissue Int.* 1985; 37: 95-97.
15. Tumber A, Papaioannou J, Breckon JJW, Meikle MC, Reynolds JJ, Hill PA. The effects of serine proteinase inhibitors on bone resorption *in vitro*. *J Endocrinol.* 2003; 178: 437-447.
16. Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38: 161-170.
17. Koenders MI, Kolls JK, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Joosten LA, Schurr JR et al. Interleukin-17 receptor deficiency results in impaired synovial expression of interleukin-1 and matrix metalloproteinases 3, 9, and 13 and prevents cartilage destruction during chronic reactivated streptococcal cell wall-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52 (10): 3239-3247.
18. Zhang F, Koyama Y, Sanuki R, Mitsui N, Suzuki N, Kimura A et al. IL-17A stimulates the expression of inflammatory cytokines via celecoxibblocked prostaglandin in MC3T3-E1 cells. *Arch Oral Biol.* 2010; 55: 679-688.
19. Kuwabara A, Tanabe N, Kawato T, Tanaka H, Nakai K, Iinuma T et al. Interleukin17A induces extracellular matrix protein expression in osteoblastic ROS17/2.8 cells. *J Hard Tissue Biol.* 2011; 20: 247-258.
20. Nakashima T, Takayanagi H. Osteoimmunology: crosstalk between the immune and bone systems. *J Clin Immunol.* 2009; 29: 555-567.
21. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998; 93: 165-176.
22. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. The role of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: Clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 4514-4521.
23. Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F et al. IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264.7 cells. *Biochimie.* 2010; 92: 398-404.
24. Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O et al. Receptor activator of NF- κ B ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sci.* 2007; 80: 1311-1318.
25. Suzuki N, Kitamura K, Nemoto T et al. Effect of vibration on osteoblastic and osteoclastic activities: analysis of bone metabolism using goldfish scale as a model for bone. *Adv Space Res.* 2007; 40: 1711-1721.
26. 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: 801-807.
27. Kalajzic Z, Peluso EB, Utreja A, Dymont N, Nihara J, Xu M et al. Effect of cyclical forces on the periodontal ligament and alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2014; 84 (2): 297-303.

Dirección para correspondencia/
Mailing address:
Dr. Salvador García-López
E-mail: drsalvadorgarcialopez@gmail.com,
sgarcia@correo.xoc.uam.mx.