

Investigación original

Influencia de la dosis de ondas de choque en células pulpares y osteoblastos

Ana Laura Ramírez-Ramírez¹, Achim M. Loske²,
Francisco Fernández², René García-Contreras^{3*},
Roberto Ruíz-Díaz¹, Gisel García-García¹

- ¹. Área de Ortodoncia, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard UNAM 2011, 37689 León, Gto., México.
- ². Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, 76230 Querétaro, Qro., México.
- ³. Área de Nanoestructuras y Biomateriales, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad León, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard UNAM 2011, 37689 León, Gto., México.

Autor de correspondencia:

René García-Contreras
E-mail: rgarcia@enes.unam.mx

Recibido: agosto 2021

Aceptado: mayo 2022

Citar como:

Ramírez-Ramírez AL, Loske AM, Fernández F, García-Contreras R, Ruíz-Díaz R, García-García G. Influencia de la dosis de ondas de choque en células pulpares y osteoblastos. [Influence on the number of shock waves and pressure in pulp cells and osteoblasts]. *Rev Mex Ortodon.* 2021; 9(3): 17-24
DOI: 10.22201/fo.23959215p.2021.9.3.88989

RESUMEN

Introducción: Las aplicaciones biomédicas de las ondas de choque se han establecido para el tratamiento de varios padecimientos. **Objetivo:** Evaluar la efectividad de las ondas de choque extracorpóreas según la presión y la cantidad de ondas aplicadas, para estimular la proliferación de un cultivo de odontoblastos y células troncales pulpares humanas. **Material y métodos:** Estudio experimental *in vitro*, prospectivo y comparativo. Se inocularon 6×10^5 células/mL de células óseas humanas y pulpares, a las que se les aplicaron diferentes dosis de ondas de choque, formándose

aleatoriamente ocho grupos por tipo celular. **Resultados:** La cantidad de ondas de choque y la presión del pulso positivo de las mismas influyen en la viabilidad celular. Al aplicar a osteoblastos 400 ondas de choque con una presión de aproximadamente 22 MPa, se obtuvo un incremento del 50% en la viabilidad celular, a las 48 horas postratamiento. **Conclusiones:** El uso de presiones bajas y cantidades altas de ondas de choque aumentan la actividad celular.

Palabras clave: Ondas de choque, Cavitación acústica, Osteoblastos, Células pulpares, Viabilidad celular.

INTRODUCCIÓN

Las aplicaciones biomédicas de las ondas de choque se establecieron para el tratamiento seguro y efectivo de varios padecimientos. La litotricia extracorpórea por ondas de choque (LEOCH) revolucionó el tratamiento de la urolitiasis a principios de la década de 1980. Le siguieron la LEOCH para tratar cálculos en la vesícula biliar, el conducto biliar, el conducto pancreático y los conductos de las glándulas salivales¹. Las ondas de choque (OCH) también se han utilizado en diferentes campos de la medicina para estimular procesos de cicatrización²⁻⁴. La terapia con OCH estimula los procesos de curación al inducir la neovascularización y la diferenciación de las células troncales mesenquimales en el tejido lesionado para permitir una curación y regeneración adecuada⁴⁻⁷. Se sabe que las células del estroma mesenquimatoso de la médula ósea tienen el potencial de diferenciarse a linaje osteogénico y varios linajes celulares relacionados con el sistema musculoesquelético^{8,9}. El tratamiento con OCH induce dichas células aumentando los marcadores de diferenciación (fosfatasa alcalina, osteocalcina) y la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-1)^{8,9}.

La interacción de OCH con la materia es un campo amplio y, aunque se ha avanzado en la comprensión de los fenómenos involucrados, aún quedan preguntas por responder¹. Uno de los principales fenómenos relacionados con la mecanotransducción, es el crecimiento y colapso de microburbujas después del paso de una OCH, denominado cavitación acústica¹⁰. El colapso es tan violento que genera chorros de fluido de alta velocidad (*microjets*) y OCH secundarias que producen esfuerzos en los tejidos, aumentando la circulación y el metabolismo, así como la permeabilidad celular¹.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de las OCH según su presión y cantidad, para estimular la proliferación de un cultivo de osteoblastos (HBC, por sus siglas en inglés, *human bone cells*) y células troncales pulpares dentales humanas (hDPSC, por sus siglas en inglés, *human dental pulp stem cells*) mediante la estimación de la viabilidad celular por actividad metabólica posterior a la aplicación de diferentes dosis de OCH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó un estudio *in vitro*, prospectivo y comparativo, utilizando células óseas humanas y pulpares. Las muestras se obtuvieron a partir de terceros molares extraídos de pacientes que acudieron a la clínica de Cirugía de la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad León, a través de un muestreo no probabilístico por cuotas con un tamaño de muestra

triplicado de un total de tres experimentos independientes. Los criterios de inclusión fueron las células óseas y pulpares humanas. Los de exclusión fueron aquellas células con más de 20 divisiones celulares y con menor densidad celular. Los de eliminación se aplicarían en caso de contaminación del cultivo celular o falta de la densidad celular.

Aislamiento y cultivo celular

Se utilizaron aproximadamente 6×10^5 células/mL de HBC y hDPSC. El cultivo primario de HBC y hDPSC fue obtenido de biopsias frescas de tejido óseo y pulpa dental, libres de patología pulpar y periapical. El protocolo de aislamiento y cultivo de HBC y hDPSC fue aprobado por el Comité de Bioética de la ENES Unidad León de la UNAM (registro CE_16/004_SN).

Aplicación de ondas de choque

Se aplicaron diferentes dosis de OCH y niveles de presión con una constante de duración de dos segundos. Además, se utilizaron ocho grupos por tipo celular (Tabla 1). Todas las células se suspendieron en un medio de cultivo (GIBCO™ DMEM (DMEM High Glucose 1X)) adicionado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico (Penstrep, Sigma-Aldrich®) y glutamina (GIBCO™, Grand Island, NY, EUA) y se colocó 1 mL de suspensión celular en pipetas de polietileno estériles de 41 mm de largo por 13 mm de diámetro (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), selladas con calor. La aplicación de las OCH se realizó en el Generador Multifuncional del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada (CFATA) de la UNAM, un equipo experimental basado en un generador de ondas de choque Piezolith 2501 (Richard Wolf GmbH, Knittlingen, Alemania), formado por 3,000 cristales piezoeléctricos colocados sobre un cascarón esférico de aluminio con un radio de curvatura de 345 mm (Figura 1). Para generar una onda de choque, los elementos piezoeléctricos reciben una descarga de alto voltaje. Debido al efecto piezoeléctrico inverso, cada elemento sufre una expansión, emitiendo una onda de compresión que se propaga a través del agua. Por efectos no lineales y la superposición de la contribución de cada elemento, se genera una onda de choque en la cercanía del centro (foco). Los elementos piezoeléctricos, sellados con una capa polimérica, forman parte del fondo de una tina de acrílico (base: 675×675 mm; altura: 450 mm). En la parte superior de la tina se instaló un posicionador

Tabla 1.
Parámetros experimentales

Grupo	Presión (MPa)	Cantidad de ondas de choque
Control		
1	9.9±0.2	200
2	9.9±0.2	800
3	21.7±0.3	200
4	21.7±0.3	400
5	21.7±0.3	800
6	42.0±1.1	200
7	42.0±1.1	800

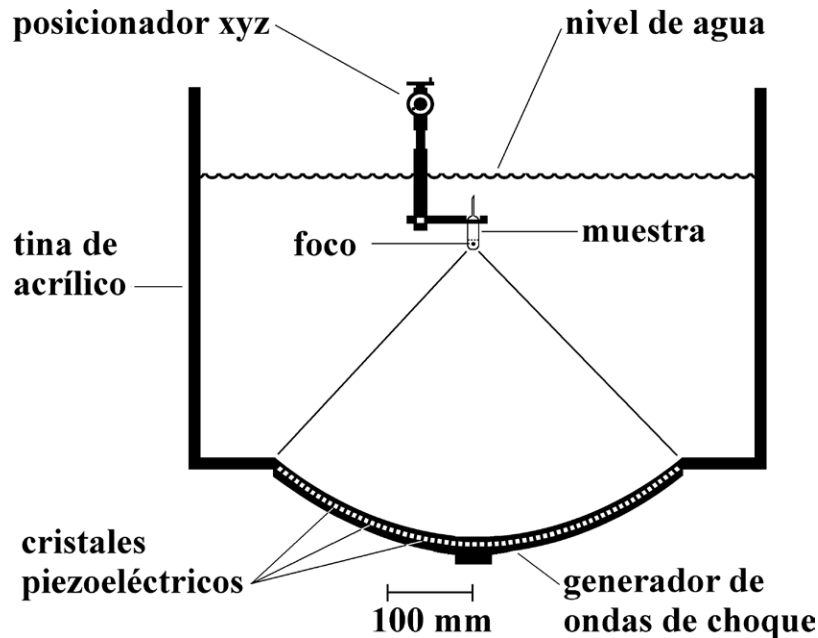


Figura 1. Esquema del generador de ondas de choque.

xyz de precisión (± 0.5 mm) para centrar las muestras en el foco. Dependiendo del voltaje, la presión del pulso positivo de la OCH varía. La temperatura y el nivel de agua se fijaron en 37°C , 80 mm arriba del plano focal, respectivamente. El Grupo control pasó por el mismo proceso, pero sin recibir OCH.

Conteo de la viabilidad y proliferación celular

Después de aplicar las OCH, se retiró el medio de las pipetas, se lavaron con 0.5 mL de PBS (pH 7.4) y las células fueron desprendidas y re-suspendidas con 1 mL de tripsina (Sigma-Aldrich®, Toluca, Edo. Mex., México). Todas las células se inocularon con medio de cultivo (DMEM) adicionado con 10% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico y glutamina en una placa de 24 pocillos e incubadas a 37°C con 5% de CO_2 y una humedad de 95%.

La viabilidad celular se estimó a las 48 h y a los 7 días por el ensayo de viabilidad celular con sal de tetrazolio (MTT) a 0.2 mg/mL (Sigma-Aldrich®) y por conteo celular en un hematocitómetro. Las células fueron incubadas por 7 horas y los cristales de formazán fueron disueltos con dimetil sulfóxido (CH_3SOCH_3 , DMSO, J.T Baker, EUA). El formazán fue transferido a una placa de 96 pocillos y analizado en un lector de microplaca (Thermo Scientific Multiskan, GO, EUA) a una longitud de onda de 570 nm. Cada ensayo se realizó por triplicado de tres experimentos independientes. Para el conteo por hematocitómetro se retiró el medio de cultivo de los pocillos de todos los grupos antes mencionados y se lavaron las células dos veces con PBS. Posteriormente, se añadieron 0.2 mL de tripsina a cada pocillo para el desprendimiento de la monocapa celular y se colocó durante 5 minutos en una incubadora (Binder™, Tuttlingen, Alemania). Posteriormente, se realizó el análisis de las muestras mediante una cámara de Neubauer de 1/10 mm de profundidad (BOECO, Hamburgo, Alemania), donde se colocó un cubreobjetos y se contaron las viables en un microscopio de contraste de fases (Leica, DMIL LED Trinocular, Massachusetts, EUA).

Análisis estadístico

El análisis fue realizado por triplicado de cada grupo de tres experimentos independientes (n=6/gp). Los datos fueron analizados con pruebas de normalidad de Shapiro-Wilks y prueba de ANOVA post-hoc de Tukey (p<0.05; coeficiente de confiabilidad 95%).

RESULTADOS

Proliferación celular

En las células HBC con una presión de 21.7 ± 0.3 de MPa y un número de 400 OCH se observó un incremento en la viabilidad celular del 50% (p<0.001) a las 48 horas de incubación ($150 \pm 3.3\%$, p<0.01), en comparación con el control (Tabla 2). En el conteo por hematocitómetro se observaron resultados similares con un mayor número de células a las 48 horas, sin mostrar diferencias significativas referentes al grupo control ($660,000 \pm 254,558$ células/mL, p>0.05). En el caso de las hDPSC, ningún grupo mostró mayor proliferación (p>0.05) en comparación con el control. Posterior a los siete días de incubación, ningún tipo de célula y grupo incrementó la proliferación celular por ninguno de los dos métodos. La mortalidad dependió de la presión y del

Tabla 2.
Viabilidad celular de ensayos MTT y Neubauer de osteoblastos y células pulpares

Grupo	MTT (%) 48 hrs	Significancia estadística	MTT (%) 7 días	Significancia estadística	Neubauer, 48 hrs (células/mL)	Significancia estadística	Neubauer, 7 días (células/mL)	Significancia estadística
Grupos de HBC								
Control	100±1.9		100±0.03		260,000±84,852		740,000±84,852	
1	62±1.9	0.005	46±3.9	0.032	220,000±84,852	0.683	260,000±84,852	0.029
2	137±46.7	0.466	75±3.8	0.070	1,020,000±311,126	0.395	420,000±141,421	0.137
3	96±10.1	0.686	41±2.3	0.017	340,000±28,284	0.395	480,000±226,274	0.329
4	150±3.3	0.006	51±0.8	0.007	660,000±254,558	0.244	220,000±84,852	0.025
5	105±1.0	0.108	21±0.9	0.005	520,000±226,274	0.329	100,000±28,284	0.039
6	61±1.5	0.002	20±0.2	0.0002	220,000±28,284	0.624	40,000±6,568	0.016
7	44±0.1	0.015	33±2.3	0.016	60,000±14,142	0.177	40,000±0	0.054
Grupos de hDPSC								
Control	100±13.5		100 ± 4.3		120,000±56,568		440,000±113,137	
1	71±0.7	0.199	25±2.4	0.006	80,000±0	0.502	240,000±113,137	0.219
2	80±2.5	0.272	85±7.7	0.168	220,000±84,852	0.316	140,000±28,284	0.148
3	76±0.1	0.244	63±3.3	0.013	160,000±0	0.506	200,000±56,568	0.157
4	67±0.1	0.178	36±0.5	0.028	180,000±84,852	0.503	40,000±28,284	0.109
5	75±3.6	0.210	82±1.3	0.085	380,000±197,989	0.297	260,000±84,852	0.223
6	59±1.6	0.143	36±0.5	0.028	40,000±14,142	0.280	40,000±14,142	0.121
7	61±1.3	0.149	34±0.22	0.029	0±0	0.204	0±0	0.114

MTT = sal de tetrazolio,

HBC = osteoblastos ("human bone cells"),

hDPSC = células troncales pulpares dentales humanas ("human dental pulp stem cells").

número de OCH, observándose que utilizando el máximo número de OCH y la máxima presión contemplada en el estudio, hubo una disminución del 70% y hasta del 100% en la viabilidad celular a partir de las 48 horas. El ensayo de MTT resultó ser más eficiente para estimar la viabilidad celular en comparación con el conteo por cámara Neubauer.

DISCUSIÓN

Es imprescindible entender la reacción de las células óseas y pulpares ante las ondas de choque. Sin embargo, en la mayoría de los estudios reportados no existe un consenso con respecto a los parámetros físicos más importantes. En el caso de estudios *in vitro*, las diferencias entre los arreglos experimentales dificultan las comparaciones entre los resultados publicados¹¹. Por ejemplo, los efectos biológicos producidos con el perfil de presión que emite el equipo usado en este estudio no son directamente comparables con aquellos que resultan al usar otro modelo, incluso si la magnitud del pulso de presión positivo y la cantidad de pulsos aplicados son equivalentes. A pesar de esto, se puede llegar a conclusiones generales.

En los resultados el presente estudio demostró que la cantidad de OCH y la presión del pulso positivo influyen en la proliferación celular. Aplicando 400 OCH con una presión de 21.7 MPa a osteoblastos humanos, se observó un incremento en la viabilidad celular del 50% ($p < 0.001$) a las 48 horas posteriores al tratamiento. Utilizando el máximo número de OCH y la máxima presión contemplada en el estudio, hubo una disminución del 70 y hasta del 100% en la viabilidad celular a partir de las 48 horas. Esto concuerda con un estudio reportado por Tam *et al.*, en el cual la densidad de energía más alta indujo una disminución significativa de células viables de un 90%¹².

El tratamiento con OCH de baja intensidad resultó en una mayor proliferación celular, aumentando el número de células viables en un 44.4% ($p < 0.001$). Las OCH de alta presión incrementaron el número de células viables un 21.7%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0.011$). Con el tratamiento de alta presión no hubo cambios significativos manteniendo constante el número de ondas aplicadas¹². Esto coincide con un estudio publicado por Martini *et al.*⁹. A las 48 horas, la viabilidad celular disminuyó aproximadamente 54% en el grupo que recibió OCH de mayor presión, en comparación con los otros grupos ($p < 0.0005$), sugiriendo que la presión de las OCH por sí sola afecta a la viabilidad de los osteoblastos, sin importar el número total de ondas aplicadas⁹. Debido a que Tam *et al.*¹² y Martini *et al.*⁹ usaron un generador de OCH electromagnético y electrohidráulico, respectivamente, no es conveniente hacer una comparación directa con los parámetros ajustados en nuestro generador piezoeléctrico. Otros autores han declarado que los efectos biológicos generalmente son proporcionales a la energía total absorbida por el tejido, pero han surgido problemas al comparar diferentes estudios que especifican sólo la densidad de flujo de energía y el número de impulsos¹³⁻¹⁵.

Al usar el nivel de presión bajo y el número de OCH alto, encontramos un incremento en la viabilidad celular en comparación con el control a las 48 horas, coincidiendo con los resultados publicados por otros autores^{12,16-18}. Sin embargo, en el día 7 detectamos un decremento en todos los grupos en comparación con el control. Este hecho no concuerda con los resultados publicados por Tam *et al.*¹² y Kusnierczak *et al.*,¹⁹ quienes detectaron un efecto a largo plazo sobre el número de células viables, la proliferación celular y la mineralización de las células periósticas humanas entre el tercero y octavo día. Debido a que las células periósticas desempeñan un papel importante en la curación ósea, se plantea la hipótesis de que un tratamiento con OCH podría ejercer un efecto estimulante retardado sobre las células periósticas. Aunque nuestros

resultados mostraron diferencias con respecto a los de Tam *et al.*¹² a largo plazo concuerdan en que una mayor cantidad de OCH de baja intensidad favorece las actividades celulares en comparación con una cantidad baja de OCH de alta intensidad.

Las perspectivas a futuro se enfocarán a incrementar el tamaño de muestra del estudio, en la detección de proteínas proinflamatorias como las interleucinas (IL), IL-1B, IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la fosfatasa alcalina, la identificación de cristales mineralizantes y determinar la capacidad de las OCH para acelerar la diferenciación celular a linajes osteogénicos, adipogénicos y condrogénicos de las células troncales humanas. Además, se sugiere que el estudio se realice como mínimo durante 30 días, ya que ese es el tiempo que tarda un efecto inflamatorio y dependiendo de los días varía la actividad celular.

CONCLUSIONES

Las presiones bajas y cantidades de OCH altas mostraron un mayor incremento en la viabilidad celular (50%) de osteoblastos humanos a las 48 horas sin mostrar un incremento en hDPSC. En un futuro el uso de ondas de choque podrá ser utilizado para aplicaciones biomédicas en odontología.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo otorgado por la laboratorista Paula Bernardino.

FINANCIAMIENTO

Se agradece el apoyo económico brindado por la Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES)-León y el CFATA de la UNAM.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Loske AM. Medical and biomedical applications of shock waves: The state of the art and the near future. In: Ben-Dor G, Sadot O, Igra O (eds). *30th International Symposium on Shock Waves 1*. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-46213-4_4
2. Haupt G. Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy, and other orthopedic diseases. *J Urol*. 1997;158(1):4-11. DOI: 10.1097/00005392-199707000-00003
3. Novak KF, Govindaswami M, Ebersole JL, Schaden W, House N, Novak MJ. Effects of low-energy shock waves on oral bacteria. *J Dent Res*. 2008;87(10):928-931. DOI: 10.1177/154405910808701009

4. Sathishkumar S, Meka A, Dawson D, House N, Schaden W, Novak MJ, *et al.* Extracorporeal shock wave therapy induces alveolar bone regeneration. *J Dent Res.* 2008; 87(7): 687-691. DOI: 10.1177/154405910808700703
5. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Translat.* 2015; 3(1): 26-33. DOI: 10.1016/j.jot.2014.07.005
6. Wang CJ, Huang HY, Yang K, Wang FS, Wong M. Pathomechanism of shock wave induced injuries on femoral artery, vein and nerve. *Injury.* 2002; 33(5): 439-446. DOI: 10.1016/s0020-1383(02)00005-0
7. Wang CJ, Wang FS, Yang KD, Weng LH, Hsu CC, Huang CS, *et al.* Shock wave therapy induces neovascularization at the tendon-bone junction. A study in rabbits. *J Orthop Res.* 2003; 21(6): 984-989. DOI: 10.1016/S0736-0266(03)00104-9
8. Wang FS, Yang KD, Chen RF, Wang CJ, Sheen-Chen SM. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF- β 1. *J Bone Joint Surg Br.* 2002; 84B(3):457-461. DOI: 10.1302/0301-620x.84b3.11609
9. Martini L, Giavaresi G, Fini M, Torricelli P, de Pretto M, Schaden W, *et al.* Effect of extracorporeal shock wave therapy on osteoblastlike cells. *Clin Orthop Relat R.* 2003; (413): 269-280. DOI: 10.1097/01.blo.0000073344.50837.cd
10. d'Agostino MC, Craig K, Tibalt E, Respizzi S. Shock wave as biological therapeutic tool: From mechanical stimulation to recovery and healing, through mechanotransduction. *Int J Surg.* 2015; 24, Pt B:147-153. DOI: 10.1016/j.ijisu.2015.11.030
11. Dietz-Laursonn K, Beckmann R, Ginter S, Radermacher K, de la Fuente M. *In vitro* cell treatment with focused shockwaves— influence of the experimental setup on the sound field and biological reaction. *J Ther Ultrasound.* 2016; 4:10. DOI: 10.1186/s40349-016-0053-z
12. Tam KF, Cheung WH, Lee KM, Qin L, Leung KS. Delayed stimulatory effect of low-intensity shockwaves on human periosteal cells. *Clin Orthop Relat R.* 2005; (438): 260-265. DOI: 10.1097/00003086-200509000-00042
13. Augat P, Claes L, Suger G. *In vivo* effect of shock-waves on the healing of fractured bone. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 1995; 10(7): 374-378. DOI: 10.1016/0268-0033(95)00009-a
14. Delius M, Draenert K, Al Diek Y, Draenert Y. Biological effects of shock waves: *in vivo* effect of high energy impulses on rabbit bone. *Ultrasound Med Biol.* 1995; 21(9):1219-1225. DOI: 10.1016/0301-5629(95)00030-5
15. Väterlein N, Lüssenhop S, Hahn M, Dellling G, Meiss AL. The effect of extracorporeal shock waves on joint cartilage: An *in vivo* study in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2000; 120(7-8): 403-406. DOI: 10.1007/pl00013770.
16. Rubin C, Turner AS, Bain S, Mallinckrodt C, McLeod K. Anabolism. Low mechanical signals strengthen long bones. *Nature.* 2001; 412(6847):603-604. DOI: 10.1038/35088122
17. Tanaka SM, Alam IM, Turner CH. Stochastic resonance in osteogenic response to mechanical loading. *FASEB J.* 2003; 17(2):313-314. DOI: 10.1096/fj.02-0561fje
18. 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. DOI: 10.1016/s0021-9290(02)00245-2
19. Kusnierczak D, Brocai DR, Vettel U, Loew M. Der Einfluss der extracorporalen Stosswellenapplikation (ESWA) auf das biologische Verhalten von Knochenzellen *in vitro* [The influence of extracorporeal shock-wave application (ESWA) on the biological behavior of bone cells *in vitro*]. *Z Orthop ihre Grenzgeb.* 2000; 138(1):29-33. DOI: 10.1055/s-2000-10109