

**EFFECTO DE LA VITAMINA D Y DE LA VITAMINA E EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS  
MESENQUIMALES IN VITRO**

**Andrea Lucia Bayona Segura**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
PROGRAMA DE ORTODONCIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
BOGOTA DC. – AGOSTO 2021**

## HOJA DE IDENTIFICACIÓN

<b>Universidad</b>	El Bosque
<b>Facultad</b>	Odontología
<b>Programa</b>	Ortodoncia
<b>Título:</b>	Efecto de la vitamina D y la vitamina E en la diferenciación de células mesenquimales in vitro
<b>Grupo de investigación</b>	Unidad de Manejo de Malformaciones Craneofaciales UMIMC
<b>Línea de investigación:</b>	Biología celular
<b>Tipo de investigación:</b>	Posgrado/grupo
<b>Estudiantes:</b>	Andrea Lucía Bayona Segura
<b>Director</b>	Lina Maria Escobar Márquez
<b>Asesor metodológico:</b>	Ingrid Isabel Mora Díaz
<b>Asesor y análisis estadístico</b>	Lina Maria Escobar Márquez

## DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

<b>OTTO BAUTISTA GAMBOA</b>	Presidente del Claustro
<b>JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO</b>	Presidente Consejo Directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL GALVIS</b>	Rector(a)
<b>RITA CECILIA PLATA DE SILVA</b>	Vicerrector(a) Académico
<b>FRANCISCO JOSÉ FALLA CARRASCO</b>	Vicerrector Administrativo
<b>MIGUEL OTERO CADENA</b>	Vicerrectoría de Investigaciones.
<b>CRISTINA MATIZ MEJÍA</b>	Secretaria General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrados
<b>MARIA ROSA BUENAHORA TOVAR</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaria Académica
<b>DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ</b>	Director Área Bioclínica
<b>ALEJANDRO PERDOMO RUBIO</b>	Director Área Comunitaria
<b>JUAN GUILLERMO ÁVILA ALCALÁ</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA DIAZ</b>	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
<b>IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES</b>	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
<b>GABRIEL EDUARDO RESTREPO TORRES</b>	Director Programa de Ortodoncia
<b>MARIA INÉS LEMUS</b>	Coordinador(a) Programa de Ortodoncia

**“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.**

## GUÍA DE CONTENIDO

<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Células mesenquimales</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Métodos de aceleración del movimiento dental</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Vitamina D</b>	<b>5</b>
<b>2.4 Vitamina E</b>	<b>8</b>
<b>3. Planteamiento del problema</b>	<b>11</b>
<b>4. Justificación</b>	<b>14</b>
<b>5. Situación Actual</b>	<b>15</b>
<b>6. Objetivos</b>	<b>20</b>
<b>6.1 Objetivo general</b>	<b>20</b>
<b>6.2 Objetivos específicos</b>	<b>20</b>
<b>7. Metodología del Proyecto</b>	<b>21</b>
<b>7.1. Tipo de estudio</b>	<b>21</b>
<b>7.2. Población y muestra</b>	<b>21</b>
<b>7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información ( Materiales y métodos)</b>	<b>21</b>
<b>7.4. Hipótesis de estudio</b>	<b>24</b>
<b>7.5 Plan de tabulación y análisis</b>	<b>25</b>
<b>8. Consideraciones éticas</b>	<b>25</b>
<b>10. Resultados</b>	<b>26</b>
<b>10.1 Disminución de la proliferación de hDPSC proporcional a la dosis y tiempo de tratamiento con vitamina D y E</b>	<b>26</b>
<b>10.2 El tratamiento simultáneo con vitaminas D y E indujo una mayor disminución de la proliferación celular que la observada con aplicaciones individuales</b>	<b>27</b>
<b>10.3 El tratamiento con vitaminas D y E condujo individual y simultáneamente a la diferenciación osteoblástica de las hDPSC.</b>	<b>28</b>
<b>11. Discusión</b>	<b>31</b>
<b>12. Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>13. Referencias bibliográficas</b>	<b>37</b>
<b>14. Anexos</b>	<b>43</b>

## LISTADO DE FIGURAS

		Págs.
<b>Figura 1</b>	Caracterización de hDPSCs. Histogramas de citometría de flujo de dos cultivos primarios de hDPSC con marcadores de superficie positivos. Análisis estadístico realizado por la Dra Lina Escobar.	<b>26</b>
<b>Figura 2</b>	Reducción del número de hDPSC inducidas por el tratamiento con diferentes dosis de vitaminas D y E. Análisis estadístico realizado por la Dra Lina Escobar.	<b>27</b>
<b>Figura 3</b>	Cambios en la proliferación y morfología de hDPSC inducidos por el tratamiento con vitaminas D y E. Análisis estadístico realizado por la Dra Lina Escobar.	<b>28</b>
<b>Figura 4</b>	Mineralización de la matriz extracelular. Análisis estadístico realizado por Dr. David Díaz Báez con base en datos entregados por la Dra Lina Escobar.	<b>29</b>
<b>Figura 5</b>	Cuantificación de la expresión génica relativa durante la diferenciación: se realizó la cuantificación de la expresión relativa de osteoblastos específicos y transcripciones mineralizantes del factor de transcripción 2 relacionado con el enrojecimiento (RUNX2), Osterix (OSX) y Osteocalcina (OCN) en hDPSC tratadas con vitamina D, E y D + E durante 7, 14 y 21 días. Análisis estadístico realizado por la Dra Lina Escobar.	<b>30</b>

## RESUMEN

### EFFECTO DE LA VITAMINA D Y DE LA VITAMINA E EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES IN VITRO

**Introducción:** El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos de la vitamina D y E en la proliferación, morfología y diferenciación de las células madre de pulpa dental humana (hDPSC). **Métodos:** En este estudio experimental in vitro, se aislaron, caracterizaron y trataron hDPSC con vitaminas D y E, individualmente y en combinación, utilizando diferentes dosis y períodos de tratamiento. Los cambios en la morfología y la proliferación celular se evaluaron mediante microscopía óptica y ensayo de resazurina, respectivamente. La diferenciación de osteoblastos se evaluó con tinción con rojo de alizarina S y expresión de genes RUNX2, Osterix y Osteocalcina usando RT-PCR en tiempo real. **Resultados:** En comparación con las células no tratadas, el número de células se redujo significativamente después del tratamiento con vitamina D (49%), vitamina E (35%) y vitaminas D + E (61%) después de 144 h. En comparación con los cultivos celulares tratados con vitaminas individuales, las células tratadas con vitaminas D + E demostraron una menor confluencia celular, con un citoplasma más extenso y plano que inició la formación de un número significativamente mayor de nódulos calcificados después de 7 días de tratamiento. Después de 14 días, el tratamiento con vitaminas D, E y D + E aumentó la transcripción de los genes RUNX2, Osterix y Osteocalcina. **Conclusiones:** Las vitaminas D y E indujeron la diferenciación osteoblástica de las hDPSC, como lo demuestra la disminución de la proliferación celular, los cambios morfológicos y la formación de nódulos calcificados, aumentando la expresión de genes de diferenciación. El tratamiento concurrente con vitaminas D + E induce un efecto sinérgico en la diferenciación hacia un linaje osteoblástico. **Palabras clave:** Vitamina D, Vitamina E, células madre, proliferación celular, movimiento dental, diferenciación.

## ABSTRACT

### **EFFECT OF VITAMINS D AND E ON THE PROLIFERATION, VIABILITY, AND DIFFERENTIATION OF HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS: AN IN VITRO STUDY**

**Introduction:** The aim of the present study was to determine the effects of vitamins D and E on the proliferation, morphology, and differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Methods:** In this in vitro experimental study, hDPSCs were isolated, characterized, and treated with vitamins D and E, individually and in combination, utilizing different doses and treatment periods. Changes in morphology and cell proliferation were evaluated using light microscopy and the resazurin assay, respectively. Osteoblast differentiation was evaluated with alizarin red S staining and expression of RUNX2, Osterix, and Osteocalcin genes using real-time RT-PCR. **Results:** Compared with untreated cells, the number of cells significantly reduced following treatment with vitamin D (49%), vitamin E (35%), and vitamins D + E (61%) after 144 h of treatment. Compared with cell cultures treated with individual vitamins, cells treated with vitamins D + E demonstrated decreased cell confluence, with more extensive and flatter cytoplasm that initiated the formation of a significantly large number of calcified nodules after 7 days of treatment. After 14 days, treatment with vitamins D, E, and D + E increased the transcription of RUNX2, Osterix, and Osteocalcin genes. **Conclusions** Vitamins D and E induced osteoblastic differentiation of hDPSCs, as evidenced by the decrease in cell proliferation, morphological changes, and the formation of calcified nodules, increasing the expression of differentiation genes. Concurrent treatment with vitamins D + E induces a synergistic effect in differentiation toward an osteoblastic lineage. **Key Words:** Vitamin D, Vitamin E, Stem Cells, Cellular proliferation, Dental Movement, differentiation



## 1. INTRODUCCIÓN

Los métodos de aceleración del movimiento dental han generado gran interés debido a que la posibilidad de reducir el tiempo de tratamiento ha resultado ser beneficiosos para la estabilidad y tranquilidad de pacientes que día a día se someten a un tratamiento de ortodoncia. Es conocido que el tratamiento ortodóncico puede producir efectos secundarios como caries, reabsorciones radiculares y enfermedad periodontal. Por esto, se han creado nuevas alternativas para reducir el tiempo de tratamiento como la aplicación de vitaminas las cuales generan un impacto no solo a nivel de aceleración de este movimiento sino en la diferenciación de células de linajes específicos que producen efectos moduladores, reguladores, supresores y protectores que pueden en un futuro mejorar las condiciones de estos individuos de manera general.

Por lo tanto, el propósito de este estudio no va encaminado a evaluar procedimientos de aceleración del movimiento sino por el contrario la evaluación de un método experimental en cual se pueda evaluar el efecto en cuanto a la diferenciación de células mesenquimales bajo la influencia de diferentes concentraciones de vitamina D y vitamina E de forma individual y combinada para ver cómo estas afectan de forma positiva o negativa tejidos óseos y dentales para así poder determinar de forma específica su efecto global en estos

## **2. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL**

### **2.1 Células Mesenquimales:**

Las células madre (MSC) fueron aisladas y caracterizadas por primera vez por Friedenstein et. al en el año 1974, actualmente se ha encontrado que pueden generarse a partir de diferentes especies y tejidos conectivos tales como el que se encuentra presente en la médula ósea, el tejido adiposo, el músculo esquelético, las membranas sinoviales, la pulpa dental, entre otros y se ha demostrado que estas pueden expandirse con éxito in vitro. Estas células presentan tres propiedades biológicas importantes que son: amplio potencial de diferenciación, secreción de factores tróficos que favorecen la remodelación de tejidos y la presencia de propiedades inmunoregulatoras. (Castro et al, 2015) (Ghaneialvar et al, 2018) Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) hacen referencia a células multipotentes, no diferenciadas que pueden realizar procesos de autorenovación a través de su capacidad de replicarse y diferenciarse en linajes celulares específicos, entre estos: (osteocitos, adipocitos y condrocitos). (Ghaneialvar et al, 2018)

Pueden clasificarse, en cuanto a la etapa del desarrollo en la cual se obtuvieron, en embrionarias y adultas, cada una con características diferentes. En esta se encuentra que las primeras (embrionarias) tienen el potencial para diferenciarse en diferentes tipos de tejidos embrionarios y extraembrionarios, mientras que las segundas (adultas) pueden hacer el mismo proceso pero generando diferentes tipos de células. (Ghaneialvar et al, 2018)

#### **2.1.1 Células madre mesenquimales derivadas del tejido dental:**

La pulpa dental es una fuente importante para la producción de células madre con gran potencial para aplicaciones en procedimientos de regeneración de tejidos. (Tatullo et al, 2014)

##### **2.1.1.1 Fisiología del desarrollo dental :**

El desarrollo dental se produce a partir de la generación de una señalización inductiva entre las células epiteliales orales y ectomesenquimales derivadas de las células de la cresta neural (CCN). Toda esta serie de interacciones forman una capa externa de esmalte formada por ameloblastos, la cual cubre la corona dental que se encuentra expuesta a la cavidad oral y por otra parte el cemento, el cual hace referencia a una delgada capa de tejido con características similares al hueso que cubre la raíz del diente. Al interior de estos tejidos

duros, se encuentra la dentina que es sintetizada por los odontoblastos y por último se encuentra en la parte central la pulpa dental, la cual está compuesta por tejido conectivo, células mesenquimales, fibras neurales, vasos sanguíneos y linfáticos. (Tatullo et al, 2014) Se ha descrito la presencia de diferentes tipos de poblaciones de células madre a nivel dental, entre las cuales se encuentran: derivadas de la pulpa (DPSC), del ligamento periodontal (PDLSC), de la papila apical (SCAP), del folículo (DFSC) y del tejido gingival (GMSCs), cada una con características importantes en cuanto a proliferación y diferenciación celular. (Ledesma-Martínez et al, 2016)

#### **2.1.1.2 Características de las células madre derivadas de tejido dental:**

- **Células madre derivadas de la pulpa dental DPSCs:** Este tipo de células son altamente proliferativas, con grandes capacidades de autorenovación y diferenciación. Se ha demostrado que pueden diferenciarse por acción de factores de crecimiento, de transcripción y proteínas de la matriz extracelular. Estas permanecen en un estado inactivo cuando se encuentran dentro de la pulpa dental, pero responden rápidamente después de que se presenta una lesión, diferenciándose inmediatamente en odontoblastos, osteoblastos y condrocitos para producir tejidos como dentina, hueso y cartílago. (Potdar, 2015)

- **Células madre derivadas de dientes deciduos exfoliados SHED:** Estas tienen la capacidad de inducir la formación de hueso y se diferencian en otro tipo de células mesenquimales no dentales en condiciones in vitro. Tienen mayores tasas de proliferación, forman agrupaciones y se diferencian en osteoblastos. Por el contrario no tienen la capacidad de regenerar alteraciones complejas de dentina y pulpa in vivo. Por otra parte son útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas debido a su capacidad para reparar neuronas motoras después de una lesión. (Potdar, 2015)

- **Células madre derivadas de la papila apical (SCAP):** Presentan gran capacidad de proliferación, y un potencial de diferenciación in vitro similar a las DPSC. Pueden generar odontoblastos, producir dentina in vivo y formación de ápices radiculares, en procesos regenerativos. (Potdar, 2015)

- **Células madre derivadas del ligamento periodontal (PDLSC):** Pueden diferenciarse en células como los cementoblastos, además son capaces de generar tejido conectivo rico en colágeno. Son ampliamente utilizadas en terapia regenerativa periodontal. (Potdar, 2015)

- **Células madre derivadas del folículo dental (DFPC):** Poseen la habilidad de producir hueso y cemento, presenta una alta plasticidad y alta capacidad de proliferación. (Stanko et al, 2018)

### **2.1.1.3 Aislamiento de células madre de pulpa dental (DPSCs):**

Debido a las características que presenta la pulpa dental en cuanto a sus componentes estructurales, se ha catalogado como una fuente importante para la obtención de células madre mesenquimales, con grandes capacidades pluripotenciales para diferenciarse en cualquier tipo de células de las tres capas germinales embrionarias. Estas células denominadas (DPSCs) se aislaron por primera vez por Gronthos et al, a partir de terceros molares y se caracterizaron como células con un alto nivel de clonogenicidad y proliferación celular. Con el conocimiento de sus propiedades actualmente se utilizan de gran manera en procesos de regeneración y reparación de tejidos obteniéndose resultados favorables en cuanto a manejo de alteraciones relacionadas con la enfermedad periodontal, reconstrucción maxilofacial, entre otros. (Ledesma-Martínez et al, 2016)

Estas células (DPSCs) pueden obtenerse además, a partir de dientes deciduos, los cuales han demostrado tener tasas de proliferación celular más altas y también de dientes permanentes exfoliados sanos. ((Stanko et al, 2018)

## **2.2 Métodos de aceleración del movimiento dental ortodóntico**

La ortodoncia es una rama de la odontología que se encarga de mejorar la función y la estética de un paciente que se somete a un tratamiento durante un periodo determinado del tiempo. Se ha estimado que en general este puede durar alrededor de 2-3 años aproximadamente y que durante este tiempo el sujeto puede estar propenso a presentar diversas alteraciones tales como lesiones de caries si no se ha hecho un adecuado manejo en cuanto a higiene oral, reabsorciones radiculares y recesiones gingivales si no se realizó una aplicación adecuada de la fuerza e inclusive desmineralización de la superficie del esmalte por los procesos de adhesión. Por lo tanto, se han desarrollado una serie de técnicas o métodos los cuales van encaminados a acelerar el movimiento dental ortodóntico con el fin de reducir el tiempo de duración total del tratamiento y así evitar las consecuencias de este a largo plazo.

Se han evaluado numerosos estudios cuyo objetivo principal está encaminado a encontrar el método más efectivo en cuanto a aceleración de movimiento dental, entre estos encontramos:

- **Métodos quirúrgicos:** Los cuales se valen del uso de procedimientos asistidos quirúrgicamente para aceleración de movimiento dental, como por ejemplo la corticotomía.
- **Métodos de estimulación mecánica:** Este es un método menos invasivo en comparación al anterior, se basa en utilizar corrientes eléctricas directas, campos magnéticos estáticos, pulsados y más recientemente ha involucrado el uso de láser de bajo nivel el cual ha mostrado resultados muy favorables.
- **Métodos farmacológicos:** Los cuales utilizan administración de medicamentos tales como vitaminas (A,C,D y E), hormonas tiroideas, corticoesteroides, prostaglandinas, los cuales de una u otra forma generan un efecto a nivel de diferenciación celular y hueso generando un cambio en cuanto al aumento o aceleración del movimiento dental. Tiene sus desventajas en cuanto a los efectos secundarios que estos puedan presentar, por lo tanto, es muy importante para el ortodoncista evaluar cuál es el de mejor elección según las condiciones que tenga el paciente. (Nimeri et al, 2013)

### 2.3 Vitamina D

Es una vitamina soluble en grasa, que participa en la homeóstasis del calcio y el fósforo en el organismo. Se encuentra en la naturaleza en dos formas, una el ergocalciferol (vitamina D2) que se deriva de la irradiación del ergosterol producido en especies vegetales y la otra el colecalciferol (vitamina D3) producida en la piel. (Valero et al, 2007)

El colecalciferol (D3), es la forma natural y el metabolito biológicamente activo de la vitamina D, con una alta afinidad por el receptor nuclear (VDR). Esta es sintetizada de forma endógena en la piel a través de radiación ultravioleta de un precursor el 7-deshidrocolesterol, el cual puede por diferentes procesos ser fotoconvertido a previtamina y posteriormente a vitamina D3 para llegar al torrente sanguíneo. Por otra parte también puede ser absorbida por la dieta a nivel del intestino como vitamina D3 o vitamina D2 y posteriormente llegar igualmente al torrente sanguíneo, aquí circula unida a la proteína DBP para convertirse a nivel del hígado principalmente por una oxidasa de función mixta del citocromo P450 (CYP) con actividad de 25-hidroxilasa llamada (CYP2R1), a 25-hidroxivitamina D (25OHD). Esta, también unida a DBP, se transporta al riñón, donde puede ser hidroxilada en 1 alfa por (CYP27B1), un CYP mitocondrial para producir la hormona bioactiva 1-25 dihidroxivitamina D (1-25(OH)2D). (Goltzman et al, 2018)

Por otra parte, la activación biológica del 1-25(OH)2D está mediada por el receptor de vitamina D (VDR), el cual es miembro de la familia de receptores de esteroides que incluye además receptores para el ácido retinóico, la hormona tiroidea, hormonas sexuales y

esteroides suprarrenales y que se caracteriza por contener un dominio de unión al ADN (DBD) rico en cisteína y un dominio de unión al ligando (LBD). (Goltzman et al, 2018) (Christakos et al, 2016)

### **2.3.1 Efectos de la vitamina D**

Los efectos de la Vitamina D son de tipo indirecto como el control de la absorción de calcio y fosfato en el intestino y la reabsorción renal de este, importante en procesos de mineralización ósea. Los efectos directos están dirigidos a la diferenciación de células formadoras de hueso (osteoblastos) para mejorar procesos de diferenciación y mineralización, ya que estas células expresan el receptor de vitamina D. (Van Driel et al, 2017)

Por lo tanto, en cuanto a los efectos que produce en la regulación de procesos a nivel de los tejidos óseos se pueden destacar los siguientes:

- ***Efectos de la vitamina D en la diferenciación de osteoblastos y la mineralización***

Los efectos directos de la  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a nivel de los osteoblastos incluye el control de la producción de proteínas de la matriz extracelular, entre estas el colágeno tipo I, la osteopontina, osteocalcina y la proteína Gla, además de efectos sobre la actividad de la fosfatasa alcalina para el suministro de fosfato para el depósito mineral según diversos estudios in vitro realizados sobre células madre mesenquimales. (Van Driel et al, 2017)

- ***Efectos de la vitamina D en procesos de mineralización***

Este proceso se puede dar en dos fases donde células como osteoblastos, condrocitos y odontoblastos mineralizan sus matrices inicialmente por medio de la formación de cristales de hidroxiapatita (HA) en vesículas de matriz extracelular donde el calcio es absorbido por estas a través de fosfolípidos ácidos y proteínas de unión al calcio regulado por las fosfohidrolasas, generando depósitos minerales dentro de estas vesículas extracelulares. Posteriormente es seguido por un proceso de propagación con una acumulación resultante de mineral en la matriz extracelular, generando mineralización por liberación de cristales de hidroxiapatita (HA) preformados. (Van Driel et al, 2017)

- ***Señalización VDR en células osteogénicas para homeostasis mineral***

La señalización VDR de los osteoblastos participa en el metabolismo del calcio principalmente cuando se da un balance negativo. Se ha demostrado según diversos

estudios que la señalización VDR mejora la resorción ósea principalmente de manera indirecta al actuar sobre los osteoblastos en lugar de osteoclastos, ejerciendo un control transcripcional directo sobre la expresión de RANKL. Es por esto, que además de estimular la resorción ósea durante un balance de calcio negativo 1,25 (OH) 2D3 también inhibe la mineralización de la matriz ósea, lo cual permite preservar niveles normales de calcio. (Christakos et al, 2016)

- ***Papel del VDR osteoblástico en el proceso de mineralización***

Los efectos de la vitamina D sobre los osteoblastos se ejerce mediante la unión al VDR nuclear y esto se podrían explicar por diferencias en la expresión de la proteína VDR durante el desarrollo de estas células, presentándose una mayor expresión en osteoblastos inmaduros con respecto a los maduros, incluyendo células de revestimiento y osteocitos. (Van Driel et al, 2017)

En cuanto al efecto de esta vitamina sobre la diferenciación y mineralización de osteoblastos, se sostiene que se da por interacción de VDR con el factor de transcripción RUNX2, generando una regulación de la expresión de proteínas no colágenas como la osteocalcina y la osteopontina. (Van Driel et al, 2017)

La vitamina D ha mostrado que no solo actúa incrementando los niveles de células osteoclásticas sino que también puede inducir un incremento de células osteoblásticas, por lo tanto formación ósea y estabilidad a largo plazo del tratamiento. El uso de 1-25 (OH) 2D3 puede eventualmente ser capaz de promover el restablecimiento del tejido que sostiene los dientes después de finalizar un tratamiento de ortodoncia. (Kawakami et al, 2004)

Adicionalmente, se ha establecido que la vitamina D puede regular positivamente a RANKL en los osteoblastos, lo que podría generar la activación de los osteoclastos a través de la vía RANK/RANKL. Por otra parte, la diferenciación de los fagocitos mononucleares en los osteoclastos, las células diana para 1 $\alpha$ ,25 (OH) 2D3 parecen ser células estromales osteoblásticas. Las células osteoblásticas producen varias proteínas como osteocalcina, proteína GLA de matriz y osteopontina en respuesta a la vitamina. Estas proteínas parecen estar de alguna manera involucrados en la diferenciación y funciones de los osteoclastos. La 1 $\alpha$ ,25 (OH) 2D3 parece estar implicada en la diferenciación de progenitores de osteoclastos de forma directa y también por un mecanismo indirecto que involucra células osteoblásticas. El papel preciso de las células osteoblásticas en el desarrollo de los osteoclastos y de qué manera la vitamina induce la diferenciación de osteoclastos y osteoblastos debe ser aclarado desarrollando estudios que permitan conocer estos procesos (Reno et al, 2005)

La idea de que la vitamina D debe funcionar en el hueso para promover la mineralización ósea ha existido desde su descubrimiento como un agente antirraquítico, sin embargo, la evidencia definitiva de esto todavía no es muy extensa ni precisa. Por el contrario, se ha acumulado mucha evidencia de que 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2D3 participa principalmente en el proceso de reabsorción ósea. La 1 $\alpha$  25 (OH) 2D3 regula la diferenciación de células progenitoras de osteoclastos hacia linaje osteoclástico; estimulando en gran medida la diferenciación y activación de fagocitos mononucleares. (Kawakami et al, 2004)

## **2.4 Vitamina E**

Conocida también como Tocoferol o tocotrienol, es un agente natural que actúa como factor inductor en la proliferación, diferenciación y maduración de células osteoblásticas, además tiene funciones antioxidantes al proteger a las células de efectos negativos de radicales libres evitando que los peróxidos se acumulen. Entre otras de sus funciones se ha demostrado que presenta propiedades antiinflamatorias ya que inhibe la liberación de algunos mediadores proinflamatorios tales como PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que se han encontrado relacionados con la predisposición a mayor pérdida ósea. Por otra parte, actúa en la adhesión de los monocitos a las células endoteliales y en procesos de la respiración. Se ha encontrado que la Vitamina E protege el cartílago contra la peroxidación lipídica celular para mantener el crecimiento normal y modelado óseo. Adicionalmente, estudios in vitro en animales indican que la Vitamina E mejora el contenido del calcio y las propiedades mecánicas del tejido óseo, ya que genera cambios en la actividad de la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y la sialoproteína ósea. (Reno et al, 2005) (Soeta et al, 2010)

- **Metabolismo y metabolitos**

La vitamina E, tocoferoles y tocotrienoles se absorben de manera similar junto con la grasa en la dieta y se secretan en pequeñas partículas de quilomicrón junto con el triacilglicerol, fosfolípidos y colesterol. Las formas de vitamina E unidas a estos se transportan a través del sistema linfático a los tejidos periféricos, entre estos músculos, médula ósea, tejido adiposo, piel y cerebro. A nivel de estos, las formas de vitamina E se recogen mediante un proceso que es realizado por el receptor de lipoproteínas mientras que los restos de quilomicrones que resultan de este proceso son recogidos posteriormente por el hígado. (Jiang, 2014)

De acuerdo al proceso catabólico de la vitamina E, se da una oxidación de la cadena lateral hidrófoba a través de reacciones catalizadas por el citocromo P450 y adicionalmente un mecanismo de sulfatación, en otras palabras se ha visto como un proceso de eliminación de



un exceso de este micronutriente. (Jiang, 2014)

El  $\alpha$ -tocoferol es la forma de vitamina E que se encuentra en las concentraciones más altas en los tejidos humanos, seguido del  $\gamma$ -tocoferol, mientras que los tocotrienoles generalmente no se detectan en los tejidos. (Cook et al, 2016)

- ***Vitamina E y hueso***

A nivel del tejido óseo se han realizado numerosas investigaciones para evaluar el efecto que genera la vitamina E en cuanto a procesos de osteogénesis y diferenciación celular para producción de hueso y cartílago. Aunque en muchos estudios se ha demostrado que se genera un efecto en procesos de aposición y reabsorción ósea, los cambios a nivel celular no son muy claros debido a que se han presentado resultados inconclusos en cuanto a que puede tener efectos tanto protectores como perjudiciales, relacionados con mayor aposición o reabsorción. (Soeta et al, 2010)

Según diversas investigaciones realizadas in vitro, se ha estudiado el papel de la vitamina E en el desarrollo de osteoclastos, encontrándose que se estimula la diferenciación de estos de una manera dependiente en cuanto a la dosis que sea administrada, llevando a un aumento en el número de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), afectando de forma directa la masa ósea. Por otro lado, la proliferación de osteoblastos no se ve afectada. (Fujita et al, 2012)

Ahmad et al (2002), demostraron previamente que la vitamina E reducía la estimulación creada por los radicales libres derivados del oxígeno en el proceso de reabsorción ósea. La Vitamina E protege de la pérdida ósea en modelos in vitro, llevando a un aumento de las proteínas de matriz ósea incluido el colágeno tipo I, la osteoclastina y el factor de crecimiento I similar a la insulina cuando se coloca en una dosis adecuada. Por otra parte, la aplicación de Vitamina E ha mostrado que mejora la calidad ósea, aunque la densidad mineral ósea (DMO) y los marcadores bioquímicos del recambio no se afectan con su administración. (Johnson et al 2016)

En contraste con estos hallazgos, Ha et al (2011), documentaron que la vitamina E (alfa-tocoferol) no inhibía la diferenciación y activación de osteoclastos en células precursoras mientras que la (alfa-tocotrienol) si la promovía. Esto puede explicarse en parte por el hecho de que se piensa que los tocotrienoles tienen una actividad antioxidante superior a la de los tocoferoles debido a la presencia de lípidos insaturados que les permiten moverse libremente en la bicapa de la membrana. (Fujita et al, 2012)

En cuanto al papel de la vitamina E en la deficiencia de estrógenos, la vitamina E puede ejercer funciones protectoras de los huesos al reducir la diferenciación de monocitos y macrófagos, precursores de células osteoclasticas y la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los linfocitos. (Fujita et al, 2012) A pesar de que se han realizado tantas investigaciones para evaluar la forma en la cual actúa la vitamina E en los tejidos óseos esta continúa siendo inconclusa, debido a que en ocasiones puede promover en otras inhibir e incluso en muchos casos no genera mayores cambios en cuanto a procesos de formación o reabsorción de hueso, por lo tanto se hace necesario realizar más estudios que evalúen a profundidad su efecto bajo la administración de dosis adecuadas y analizar realmente los cambios que se generan en cuanto a los aspectos celulares relacionados con osteoblastos y osteoclastos generados por ella.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 3.1 Descripción del problema

La ortodoncia es una rama de la odontología que se encarga de mejorar la función y la estética de una persona que se somete a un tratamiento durante un periodo aproximado de 2 a 3 años; en este tiempo, se pueden presentar diversas alteraciones tales como lesiones de caries, reabsorciones radiculares, recesiones gingivales y desmineralizaciones de la superficie del esmalte por los procesos de adhesión. Por lo tanto, se han desarrollado una serie de técnicas o métodos los cuales van encaminados a acelerar el movimiento dental ortodóncico con el fin de reducir el tiempo de duración total del tratamiento y así evitar que se presenten este tipo de alteraciones a largo plazo. (Nimeri et al, 2013)

Desde hace algunos años los métodos utilizados para la aceleración del movimiento dental han cobrado gran importancia. Su impacto en cuanto a la reducción de la duración total del tratamiento de ortodoncia con respecto al tiempo y la disminución de los efectos secundarios generados por este, han sido un impulso para el desarrollo de una serie de estudios que buscan determinar de manera eficaz que tipo de método puede ser considerado como de mejor elección. Varios de los resultados encontrados son contradictorios y falta un consenso general para utilizar el mejor de estos procedimientos, garantizando en gran parte la eliminación de efectos adversos que puedan afectar la estabilidad del tratamiento. (Chinnan et al, 2018) (Barztela et al, 2008)

El movimiento dental ortodóncico se da en presencia de estímulos mecánicos en los cuales se produce remodelación del ligamento periodontal y del hueso alveolar. Durante el movimiento ortodóncico se presenta reabsorción ósea en el lado de presión y formación de hueso en el lado contrario o lado de tensión. Estos fenómenos pueden controlarse con la fuerza que es aplicada y la forma en la que esta impacta en la generación de una respuesta biológica en los tejidos. Por lo tanto, muchas de las técnicas utilizadas tienen un efecto directo en la forma en la que se dan estos procesos, generando cambios en la reacción de los componentes estructurales y celulares de un organismo, llevando a un incremento en la tasa de movimiento; sin embargo estos hallazgos siguen generando resultados inconclusos.

Actualmente existen numerosos métodos para el desarrollo de estos procesos, entre los cuales se encuentran métodos invasivos tales como las cirugías periodontales. En este tipo de técnicas se destaca la corticotomía cuyo fin radica principalmente en la eliminación de las fibras supracrestales para permitir un movimiento más acelerado. Se ha demostrado que este procedimiento es efectivo, pero genera un trauma adicional en el paciente, un riesgo potencial de infección que puede llevar en muchos casos al fracaso. Estas son las razones por las cuales desde hace algún tiempo se han venido estudiando y realizando investigaciones tanto in vivo como in vitro para evaluar la efectividad de diversos agentes

farmacológicos como la prostaglandina, la paratohormona (PTH), vitaminas entre las cuales encontramos la A,C,D y E, entre otros, encontrándose que llevan a un incremento significativo del movimiento dental a través de la inducción de la diferenciación y proliferación de células osteoclasticas (importantes para el proceso de reabsorción), sin embargo sus efectos sobre la formación y actividad osteoblástica y de sus efectos secundarios siguen siendo un gran tema de incertidumbre y debate. (Shetty et al, 2015)

La vitamina D, es un importante agente que se encuentra involucrado en procesos relacionados con la homeostasis del calcio y el fósforo en el organismo. Se ha demostrado que interviene tanto en procesos de aposición como de remodelación de hueso. Esto se da específicamente porque ejerce efectos sobre la diferenciación y proliferación de células osteoblásticas a partir de células mesenquimales, estimulando procesos de mineralización. Por otra parte, se ha evidenciado que genera efectos en la activación de los osteoclastos a través de la vía RANK/RANKL, aumentando la actividad de estas células, produciendo también remodelación de los tejidos óseos. Todo esto lleva a deducir que esta vitamina juega papeles esenciales en procesos de estabilización de los dientes que son sometidos a tratamiento de ortodoncia, pero debido a que estos resultados siguen siendo inexactos se encuentran dudas en cuanto al mecanismo biológico y celular que lleva a que esta vitamina genere producción, diferenciación y proliferación de este tipo de células. (Nakamachi et al, 2018)

En cuanto a la vitamina E, se ha encontrado que presenta numerosas propiedades entre las cuales se destaca que es un agente antioxidante al proteger a las células de efectos negativos de radicales libres, evitando que los peróxidos se acumulen. Presenta además funciones antiinflamatorias y se ha encontrado relación de la Vitamina E con proliferación, diferenciación y maduración de células osteoblásticas. Sin embargo, estos hallazgos siguen siendo controversiales, debido a que dependiendo la dosis en la cual sea administrada puede aumentar o inhibir la producción de este tipo de células. (Cook et al, 2016) (Fujita et al, 2012)

Debido a los resultados controversiales que se han obtenido sobre el efecto de estas dos vitaminas en la diferenciación y función de osteoblastos, es importante el desarrollo de este estudio, cuyo objetivo es evaluar la forma en la que estas influyen en la diferenciación de células mesenquimales de pulpa dental, partiendo de una línea de investigación previa que tuvo como objetivo realizar una fase inicial sobre las dosis indicadas para la generar diversos cambios a nivel molecular, encontrando que a mayores concentraciones de ambas se produce tanto proliferación como inhibición de este proceso de cambio morfológico de las células, por lo tanto se hace necesaria la continuación de esta fase para llegar a concluir por medio de pruebas moleculares como PCR la forma en la que estas vitaminas influyen en la generación de cambios, adicionalmente establecer el efecto que pueden producir actuando tanto a nivel individual como en conjunto, sobre procesos fisiológicos de formación de

hueso teniendo en cuenta variables tales como la dosis aplicada, el tiempo de tratamiento evaluado y pruebas histológicas como tinciones que nos permitan evaluar la cantidad de mineralización ósea que se puede producir en las células sometidas a tratamiento.

### **3.2 Pregunta de investigación**

¿Cuál es el efecto de la vitamina D y la vitamina E, en la diferenciación de células mesenquimales hacia osteoblastos in vitro?

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existen una serie de métodos, procedimientos y técnicas cuyo principal objetivo es producir un aumento en la cantidad de movimiento dental que es producido por un tratamiento de ortodoncia. Muchos de estos parten de procedimientos quirúrgicos, los cuales se ha demostrado que además de ser efectivos, pueden generar en algunas ocasiones alteraciones o efectos adversos como reabsorciones radiculares, recesiones gingivales y caries debidos a complicaciones tales como infecciones, dolor y molestia del paciente. Por lo tanto, se han ido creando numerosas alternativas que van encaminadas al uso de agentes farmacológicos que interactúan a nivel celular con una serie de moléculas y vías de señalización que pueden, en muchos de los casos, ejercer un efecto directo en la aceleración del movimiento ortodóncico, logrando a largo plazo evitar los efectos adversos.

Entre los métodos que han sido implementados para el control del remodelado óseo, el uso de vitaminas como la vitamina D y de la vitamina E han generado buenos resultados pero inconclusos, debido a que en muchos estudios se ha evidenciado que puede estimular, inhibir o no generar cambios significativos en las células involucradas en cuanto a la tasa de movimiento producido, esto puede deberse en muchos casos a que su efecto de inducción o represión está influenciado por la dosis a la cual han sido aplicadas y el tiempo de duración, mientras que por otra parte su mecanismo biológico aún resulta ser poco comprendido a profundidad. (Fujita et al, 2012) (Nakamachi et al, 2018) (Ha et al, 2011)

Por lo anterior se requiere la realización de más estudios para poder determinar en específico que tipo de células se diferencian después de la aplicación de este tipo de vitaminas, ya que no se conoce con claridad si potencian la diferenciación de ambos tipos de células óseas (osteoblastos y osteoclastos) importantes en los procesos de osteogénesis y adicionalmente, no se ha evaluado el efecto en proliferación y morfología, que tiene la aplicación de vitamina D y de vitamina E de forma individual y combinada en células mesenquimales in vitro. Es por esto que el objetivo de este estudio va encaminado a observar los cambios que se puedan presentar teniendo en cuanto dosis y tiempo de tratamiento al cual serán expuestas las células para poder determinar posteriormente el efecto que se tiene en la remodelación de tejido óseo.

Existe una necesidad evidente de investigar con mayor profundidad los mecanismos moleculares subyacentes al movimiento dental acelerado del diente tratado con ortodoncia con el fin de dilucidar los factores clave que hacen que el procedimiento pueda ser más eficaz con el menor número de efectos secundarios, los tiempos más cortos, y los costos más bajos para los pacientes. Los nuevos conocimientos en este campo permitirán cambiar y mejorar la terapia ortodóncica y su práctica en el futuro.

## 5. SITUACIÓN ACTUAL EN EL ÁREA DE INVESTIGACIÓN

La remodelación de los tejidos de soporte dental, constituye un pilar fundamental en el tratamiento de ortodoncia. Es por esto que se requiere una respuesta óptima de estos frente a la aplicación de una fuerza, la cual tiene como objetivo generar una activación de las células que componen el hueso para poder inducir cambios inflamatorios y así producir el movimiento deseado. Este movimiento va a depender en parte de las células que sean diferenciadas y su reacción al tipo, dirección, magnitud y duración de la fuerza aplicada.

Actualmente, numerosos pacientes acuden a la consulta en ortodoncia con el fin de buscar solución a sus problemas a nivel estético y oclusal, pero muchos de estos buscan una resolución que sea rápida para evitar los efectos secundarios que se producen en este tipo de tratamiento, como lo son caries, reabsorciones radiculares, recesiones gingivales, entre otras. Por esto desde hace algún tiempo se han venido evaluando numerosos métodos que produzcan una aceleración del movimiento dental. Estos incluyen métodos invasivos como las corticotomías, microperforaciones y otros van más enfocados a un tipo de terapia un poco más conservadora con la aplicación de diferentes sustancias como medicamentos, entre las cuales encontramos la vitamina D y E las cuales han traído resultados favorables pero aún inconclusos en cuanto al verdadero efecto producido a nivel celular y molecular.

Como se sabe, la vitamina D es una vitamina soluble en grasa, la cual participa en la homeóstasis del calcio y el fósforo en el organismo. La Vitamina D se encuentra en la naturaleza en dos formas, una el ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) que se deriva de la irradiación del ergosterol producido en especies vegetales y la otra el colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) producida en la piel. El colecalciferol es la forma natural y el metabolito biológicamente activo de la vitamina D, con una alta afinidad por el receptor nuclear (VDR), sintetizado de forma endógena en la piel a través de radiación ultravioleta de un precursor el 7-deshidrocolesterol, el cual puede por diferentes procesos ser fotoconvertido a previtamina y posteriormente a vitamina D<sub>3</sub> para llegar al torrente sanguíneo. (Valero et al, 2007)

Se ha encontrado que la vitamina D no solo actúa incrementando los niveles de células osteoclásticas sino que también puede inducir un incremento de células osteoblásticas, por lo tanto formación ósea y estabilidad a largo plazo del tratamiento. En otras palabras, el uso de 1-25 (OH) 2D<sub>3</sub> puede eventualmente ser capaz de promover el restablecimiento del tejido que sostiene los dientes después de finalizar un tratamiento de ortodoncia, aunque esto continua siendo evaluado en la actualidad. (Nakimichi et al, 2018)

Geng y col en el año 2013, evaluaron células madre mesenquimales aisladas de médula ósea que tienen la capacidad de producir células como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, entre otros. Encontrando que la diferenciación in vitro de osteoblastos es estimulada por la vitamina D, ya que esta promueve procesos de osteoblastogénesis, dependiendo de la dosis

y las condiciones en las cuales sea administrada. Se demostró un papel autocrino/paracrino en el metabolismo de esta vitamina que promueve la diferenciación celular, llevando esencialmente a la formación de matriz ósea. (Geng et al, 2013)

Suda y col en el año 2015, demostraron que la vitamina D es un factor nutricional importante para prevenir fallas en la formación y mineralización de tejidos óseos. Estos autores afirmaron que aunque la vitamina D estimula estos procesos, no existe evidencia directa que apoye este concepto actualmente, ya que se ha encontrado que esta vitamina funciona en procesos de reabsorción y remodelación induciendo la sobreexpresión de RANKL en los osteoblastos. Adicionalmente, su estudio en ratones con alteraciones a nivel del receptor VDR reveló que el papel fisiológico de la vitamina D depende del equilibrio que existe entre el calcio y el fosfato y adicionalmente la interacción que se presente con la hormona PTH. (Suda et al, 1992)

Yang y col en 2017, realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la relación entre la 1,25 D y la actividad osteogénica, utilizando un ensayo primario de osteoblastos derivado del cráneo de ratones, abarcando el proceso de desarrollo y diferenciación de osteoblastos desde etapas inmaduras hasta la diferenciación a células maduras, donde evaluaban niveles de transcripción de marcadores de diferenciación de osteoblastos y osteocitos. Ellos determinaron que la formación ósea y mineralización in vitro se suprime con el tratamiento farmacológico con 1,25D. Además de la función en el proceso de mineralización, se confirmó que los osteoblastos son importantes reguladores de la formación y la actividad de osteoclastos a través de la activación del sistema RANK-RANKL-OPG. Según estos autores, las etapas iniciales de diferenciación de osteoblastos y la deposición mineral son independientes del sistema 1,25/VDR, sin embargo este receptor (VDR) es importante en las últimas etapas de diferenciación de osteoblastos/osteocitos a largo plazo. Por lo tanto se refuerza la idea de que la señalización VDR es importante para las células osteoblásticas y adicionalmente para la osteoclastogénesis realizada por los osteoclastos, ya que este VDR influye en el efecto de la 1,25D sobre la expresión osteogénica en términos de magnitud y dirección. (Yang et al, 2018)

Por otra parte, Nakamichi y col en 2018, demostraron que las formas activas de la vitamina D mejoran el proceso de osteoclastogénesis tanto in vivo como in vitro a través del receptor VDR, especialmente cuando se administraban concentraciones altas y no las esperadas en condiciones fisiológicas, aumentando significativamente la densidad mineral ósea (DMO). Estos autores realizaron su estudio en ratones, encontrando que el hueso es uno de los principales órganos diana de la vitamina D y no solo para células de la línea osteoblástica sino también ejerce un efecto a nivel de condrocitos hipertróficos promoviendo osificación endocondral. Este estudio evaluó la acción del receptor VDR a nivel de modelos murinos de tipo silvestre y con la presencia de algún tipo de mutación, encontrándose que



efectivamente el VDR se expresa a nivel de osteoblastos y osteocitos en hueso, pero cuando se presentaba alguna alteración estos no presentaban anomalías evidentes en la mineralización, formación o reabsorción ósea, llegando a la conclusión de que el VDR en células de osteoblastos y osteoclastos no desempeña un papel importante en el metabolismo óseo fisiológico, pero que por otra parte cuando se estimulaba el tratamiento con 1,25D, se producía mayor producción de osteoclastos, por lo tanto la vitamina D puede estar involucrada tanto en procesos de reabsorción o de aposición dependiendo de la dosis bajo la cual sea administrada, llevando resultados no concluyentes con respecto a su mecanismo molecular y celular. (Nakamachi et al, 2018)

Wang y col en el año 2018, evaluaron los efectos de VD3 de 25(OH)D3 y  $1\alpha$  25(OH)D3 en diferentes concentraciones, en la diferenciación temprana y tardía de osteoblastos, encontrando que bajo los dos formas de vitamina D se encontraba cambios a nivel de células osteoblásticas pero mayor alteración en la metabolización directa a nivel de 25(OH)D3. Entre sus hallazgos está que a grandes concentraciones se promovía significativamente la proliferación de osteoblastos y que marcadores osteogénicos tempranos como (Runx2 y fosfatasa alcalina) aumentan de forma dependiente a la dosis administrada. Además que la 25(OH)VD3 acelera la expresión de genes y proteínas como la osteocalcina y el nivel de biomineralización de osteoblastos. (Wang et al, 2018)

Con relación a la vitamina E, poco se sabe acerca de su mecanismo de acción a nivel celular y molecular, por lo tanto se han planteado diversos estudios en los cuales se han encontrado resultados que aun siguen sin ser concluyentes.

Se conoce que esta vitamina también llamada tocoferol o toctrienol, es un agente natural que actúa como factor inductor en la proliferación, diferenciación y maduración de células osteoblásticas, que además tiene funciones antioxidantes al proteger a las células de efectos negativos de radicales libres, y que presenta propiedades antiinflamatorias ya que inhibe la liberación de algunos mediadores proinflamatorios tales como PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 que se han encontrado relacionados con mayor predisposición a pérdida ósea. (Soeta et al, 2010)

Por otra parte actúa en la adhesión de los monocitos a las células endoteliales y en procesos de la respiración. Adicionalmente entre otros de los hallazgos relacionados con esta vitamina se ha encontrado que protege el cartílago contra la peroxidación lipídica celular para mantener el crecimiento normal y modelado óseo. Estudios in vitro y en animales indican que también mejora el contenido de calcio y las propiedades mecánicas del tejido óseo, ya que genera cambios en la actividad de la fosfatasa alcalina, la osteocalcina y la sialoproteína ósea. (Reno et al, 2005)

De acuerdo a la acción de la vitamina E, Ha y colaboradores, en el año 2011, realizaron un

estudio para evaluar la forma en la que la vitamina E en sus dos isoformas ( $\alpha$ -tocoferol y  $\alpha$ -tocotrienol) podían modular la reabsorción ósea osteoclástica a partir de macrófagos derivados de la médula ósea de roedores (BMM), encontrando entre sus resultados que el  $\alpha$ -tocotrienol inhibe la osteoclastogénesis en cocultivos de osteoblastos, impidiendo la diferenciación de osteoclastos inducido por RANKL en los osteoblastos y adicionalmente que este no afecta la supervivencia de osteoclastos maduros, llevando a la conclusión que los tocotrienoles tienen propiedades directas que influyen en los procesos de resorción ósea, mientras que el  $\alpha$ -tocoferol no. (Ha et al, 2011)

Por otra parte, Fujita y col, en el año 2012, evaluaron la acción de la vitamina E en ratones que presentaban una deficiencia en la proteína de transferencia del  $\alpha$ -tocoferol comparándolo con un modelo de ratón silvestre, encontrando que aquel espécimen que presentaba alteración o deficiencia de vitamina E, mostraba una mayor densidad ósea a nivel de las vértebras y huesos largos como resultado de una disminución en la reabsorción de hueso, por lo tanto en su estudio se concluyó que la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) estimula la fusión de osteoclastos mediante la inducción de una proteína transmembrana específica de células dendríticas. Adicionalmente, evaluaron el papel de la vitamina E en el desarrollo de células osteoclásticas in vitro a partir de células madre derivadas de ratones salvajes y estimuladas por RANKL con  $\alpha$ -tocoferol. Dando como resultado que el  $\alpha$ -tocoferol estimuló la diferenciación de los osteoclastos de una manera dependiente de la dosis, demostrándose un aumento de la cantidad de fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), mientras que la proliferación de los precursores de los osteoclastos y la supervivencia de los osteoclastos maduros no presentaron cambios significativos. Por otra parte, la diferenciación y proliferación osteoblástica tampoco fue alterada por este, por lo cual estos autores concluyen que la vitamina E estimula la maduración de osteoclastos y que adicionalmente esta presenta un papel importante en el control de la masa ósea. (Fujita et al, 2012)

En contraste, Urban y col, en el año 2012, realizaron un estudio a partir de células primarias de osteoblastos bovinos derivados del periostio del metacarpo de una ternera para evaluar la acción de la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) en cuanto a la diferenciación de células comparado con la vitamina C. Encontrando entre sus hallazgos que no se presentaba aumento en la diferenciación celular, ni en el número de proteínas de matriz extracelular como colágeno tipo I, osteocalcina y osteonectina. Estos autores concluyen que esto se puede producir por la administración de una concentración inadecuada de la vitamina E la cual puede generar efectos tóxicos en las células evitando su diferenciación y proliferación. (Urban et al, 2012)

Chin y col, en el año 2015, evaluaron los efectos producidos por los Tocotrienoles en los tejidos óseos de ratones que habían sido gonadectomizados y que presentaban una

reducción significativa del volumen de hueso, número y grosor trabecular con respecto a un grupo control, encontrando que esta isoforma de la vitamina E presenta efectos en cuanto a protección ósea cuando los modelos utilizados en el estudio presentaron deficiencia de estrógeno, testosterona, glucocorticoides, entre otros. Entre sus hallazgos está que el tocotrienol aumenta el número de osteoblastos, la deposición mineral y la formación ósea, disminuyendo de manera significativa el número de osteoclastos, la erosión en el hueso y las actividades de remodelación ósea mejorando la microarquitectura ósea en especímenes osteopénicos. Estos autores concluyen que estos resultados se pueden atribuir a la acción antioxidante, antiinflamatoria y genética que presenta el tocotrienol, pero que deben seguirse realizando estudios para encontrar resultados concluyentes. (Johnson et al, 2016)

Conforme a todos los estudios que se han elaborado en cuanto a la acción de la vitamina E tanto in vivo como in vitro, Galli y col en el año 2017 plantean que son muchos los resultados que se pueden obtener con la utilización de esta vitamina, pero que aún hace falta dilucidar realmente sus efectos, la acción a nivel molecular de sus metabolitos con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas adecuadas y así aprovechar al máximo sus acciones antioxidantes y antiinflamatorias. (Galli et al, 2016)

## 6. OBJETIVOS

- **Objetivo general:** Evaluar el efecto de la administración de la vitamina D y la vitamina E sobre la diferenciación de células mesenquimales in vitro.

- **Objetivos específicos:**

- Determinar el efecto de la vitamina D sobre la diferenciación de células mesenquimales in vitro en diferentes tiempos y concentración.
- Determinar el efecto de la vitamina E sobre la y diferenciación de células mesenquimales in vitro en diferentes tiempos y concentración.
- Evaluar el efecto en la diferenciación de células mesenquimales in vitro al ser tratadas con la vitamina D y la vitamina E de forma combinada.

## 7. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

### 7.1 Tipo de estudio:

Experimental in Vitro

### 7.2 Muestra:

Se analizarán células mesenquimales obtenidas a partir de pulpa de premolares con extracción indicada debido a tratamiento de ortodoncia. Se analizarán tres cultivos independientes obtenidos de tres donantes en el pasaje 4 con tres réplicas de cada uno (n=9).

### 7.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información:

#### 7.3.1 Obtención de células mesenquimales a partir de pulpa dental:

Se obtendrán pulpas dentales de premolares sanos de individuos entre 18-20 años, que requieran extracción debido a tratamiento ortodóncico. Se seguirá el protocolo de Gronthos *et al.* En breve, los dientes serán descontaminados posterior a la exodoncia por inmersión en hipoclorito de sodio al 5% durante 5 segundos y seccionados con pieza de alta para la obtención del tejido pulpar completo. Los explantes se colocarán en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa Hyclone (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germano), suplementado con suero fetal bovino (FBS) Hyclone (Thermo Fisher Scientific) y antibióticos. Se utilizará un medio de disociación que contiene colagenasa (3 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y dispasa (4 mg/ml) (Gibco) por 16 h en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, se centrifugará la suspensión celular y el precipitado celular se resuspenderá en medio para ser sembrado en frascos de 25 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar una confluencia del 80%. (Gronthos et al, 2002)

#### 7.3.2 Caracterización fenotípica y funcional de células mesenquimales:

Para la caracterización de las células mesenquimales se tendrán en cuenta los siguientes criterios:

- **Caracterización morfológica:** Se determinarán características morfológicas de células mesenquimales, las cuales deben observarse alargadas, en forma de huso, estrechas, de aspecto fibroblastoide, núcleo central y abundantes lisosomas. (Flores-Figueroa et al, 2006)

- **Caracterización por citometría de flujo:** Se utilizarán varios marcadores de membrana que serán detectados mediante citometría de flujo debido a que no se ha identificado un marcador específico de células mesenquimales. Previamente, las células cultivadas se tripsinizarán, se centrifugarán y se resuspenderán en 100µL de buffer salino. Posteriormente, las células se incubarán en tubos distintos con 10µL de anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos, como son CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 (BD Biosciences). Como control negativo se utilizarán células sin marcaje de anticuerpos.

El análisis se realizará en un citómetro de flujo. La población homogénea se caracteriza por presentar células positivas para CD73, CD90, CD105 y negativas para CD34, CD45. (Arévalo et al., 2007; Arbósa et al., 2013)

- **Caracterización funcional:** Las células mesenquimales poseen la capacidad de diferenciarse a diversos tipos celulares entre los que están los osteoblastos y los osteocitos. Para lograr su diferenciación a osteoblastos se cultivarán en medio Modified Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (Sigma Aldrich) suplementado con 0,1µM dexametasona, 10mM β-glicerolfosfato y 0,2mM de ácido ascórbico. Luego de 21 días de tratamiento con este medio se evaluará la diferenciación celular. (Rodríguez-Pardo et al, 2010)

### **7.3.3 Tratamiento de células mesenquimales con Vitamina E y D:**

Las células mesenquimales serán cultivadas en frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> hasta alcanzar el 80% de confluencia y posteriormente se disociaran con 0,25% de Tripsina (DIFCO) y se sembraran en microplacas de 12 pozos, 5000 células por pozo. Estas células serán tratadas con diferentes concentraciones de Vitamina D y vitamina E a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas por triplicado.

### **7.3.4 Determinación de la tasa de proliferación de células mesenquimales y osteoblastos:**

La proliferación celular de las células mesenquimales con o sin tratamiento con Vitamina D y E y de los osteoblastos obtenidos a partir de ellas, se evaluarán por las técnicas de exclusión del colorante tripán blue, y por la prueba fluorométrica de resazurina.

- **Ensayo de exclusión de azul tripán:**

Las células muertas presentan pérdida de la integridad de la membrana lo cual les permite incorporar el colorante obteniéndose coloración azul en el citoplasma. Por el contrario, las

células vivas excluyen el colorante. El recuento de células vivas y muertas es realizará en un hemocitómetro.

- **Prueba fluorométrica resazurina:**

La resazurina es un compuesto de color azul no fluorescente, y se reduce irreversiblemente a resofurina (rosado altamente fluorescente) y luego en dihidroresofurina (incolore y no fluorescente). La transformación de este compuesto se asocia solo con la actividad de las mitocondrias de células vitales. La resofurina es difundida al medio permitiendo el monitoreo de la proliferación o muerte celular. A las células incubadas se les adicionará la solución de resazurina 4,4µg por pozo y se dejarán incubar a 37°C durante 4 horas, posteriormente, se analizarán en un lector Tecan Infinite M2000 Pro, a una longitud de onda de 535-595nm. (Escobar y Aristizábal, 2010)

### **7.3.5 Diferenciación y caracterización de osteoblastos:**

- **Diferenciación celular:**

Las células mesenquimales con o sin tratamiento con Vitamina D y/o E, serán cultivadas en medio de inducción osteogénica que contiene medio DMEM, suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina, y 100 ug/mL de estreptomycin, 0,1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich), 5 mM de β-glicerofosfato (Santa Cruz, CA, USA), 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). Las células se tratarán con el medio de diferenciación por 24 h, 7, 14 y 21 días, en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las muestras control negativo serán mantenidas sólo en medio de cultivo, sin factores de diferenciación osteoblástica.

- **Caracterización mediante PCR en tiempo real:**

Para confirmar la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos se evaluará la expresión del gen RUNX2, el cual constituye la primera evidencia de la diferenciación osteogénica y cuyo máximo nivel se alcanza en los preosteoblastos. También se determinará la presencia del gen osterix (OSX) y los marcadores de genes como osteopontina (OP), colágeno tipo 1(COL1), fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OC), los cuales indican el progreso de la diferenciación. (Arévalo et al, 2007; Huang et al, 2009; Muñoz, 2012)

- **Actividad Fosfatasa alcalina:**

Para comprobar la diferenciación se analizará la actividad fosfatasa alcalina mediante tinción con la solución Nitroblue tetrazolium chloride 5 bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP) (Roche) durante 20-30 minutos y se contrastarán con 1mL de hematoxilina (Merck) durante 2 minutos. Las células con actividad fosfatasa alcalina tomarán coloración violeta intensa que serán cuantificadas por conteo directo. ( Muñoz, 2012)

- **Evaluación de mineralización *in vitro*:**

Tinción con rojo de alizarina

Se sembrarán  $1 \times 10^4$  células de la pulpa dental en placas de 12 pozos y se inducirá la diferenciación osteoblástica por 7, 14 y 21 días. En cada momento de prueba, las muestras serán fijadas con PFA al 4% por 30 min y teñidas con rojo alizarina S (Sigma-Aldrich) al 2% diluido en agua destilada estéril (pH 4.1) x 15 min a TA. Siguiendo el protocolo establecido por Gregory *et al.* con algunas modificaciones, el tinte se extraerá con PBS al 1X durante 30 min y solución de ácido acético e isopropanol al 10%, durante 16 h a TA. La formación de nódulos de calcificación, se analizará bajo microscopio invertido y se determinará la absorbancia del tinte extraído por medio de un lector de multiplacas Infinite M200, Tecan a 550 nm.

## **7.4 HIPÓTESIS DE ESTUDIO:**

**7.4.1 Hipótesis Nula:** No existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la diferenciación de células mesenquimales *in vitro* con la aplicación de vitamina D.

No existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la diferenciación de células mesenquimales *in vitro* con la aplicación de vitamina E.

**7.4.2 Hipótesis Alternativa:** Existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la diferenciación de células mesenquimales *in vitro* con la aplicación de vitamina E.

Existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la diferenciación de células mesenquimales *in vitro* con la aplicación de vitamina E.



### **7.5 PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS:**

Los datos se expresarán como promedio  $\pm$  SD. Un valor de  $P < 0.05$  se considerará una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. Para analizar diferencias entre grupos de las variables con distribución normal se utilizará la prueba t-Student y para las que no presenten distribución normal se utilizará la prueba de U Mann Whitney.

Todos los experimentos fueron realizados en tres cultivos independientes con tres réplicas por condición. El análisis estadístico se realizará utilizando el software SPSS, versión 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)

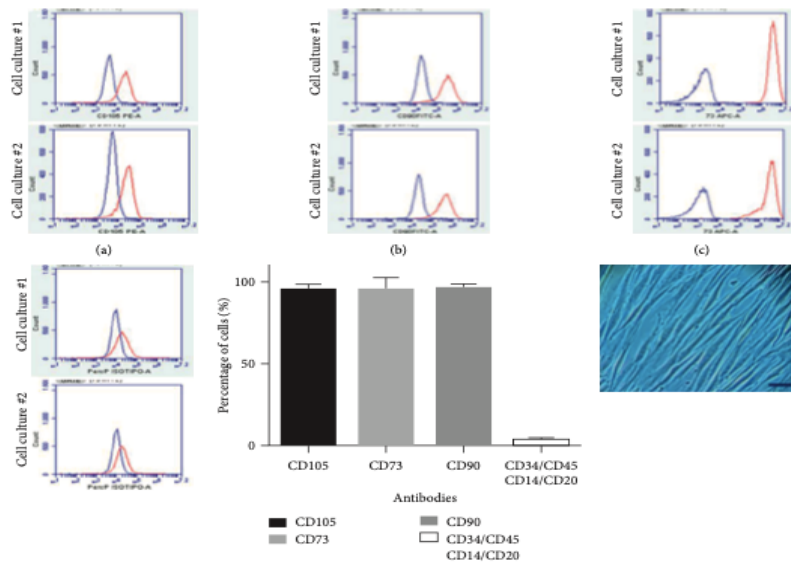
### **8. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Para la realización de este proyecto se tienen en cuenta las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud según la resolución 008430 capítulo I artículo 11, expedida por el ministerio de salud en 1993, el cual regula los aspectos éticos de la investigación en seres humanos. Según este, el uso de dientes permanentes extraídos por indicación terapéutica se considera como una investigación con riesgo mínimo. (Anexo 1)

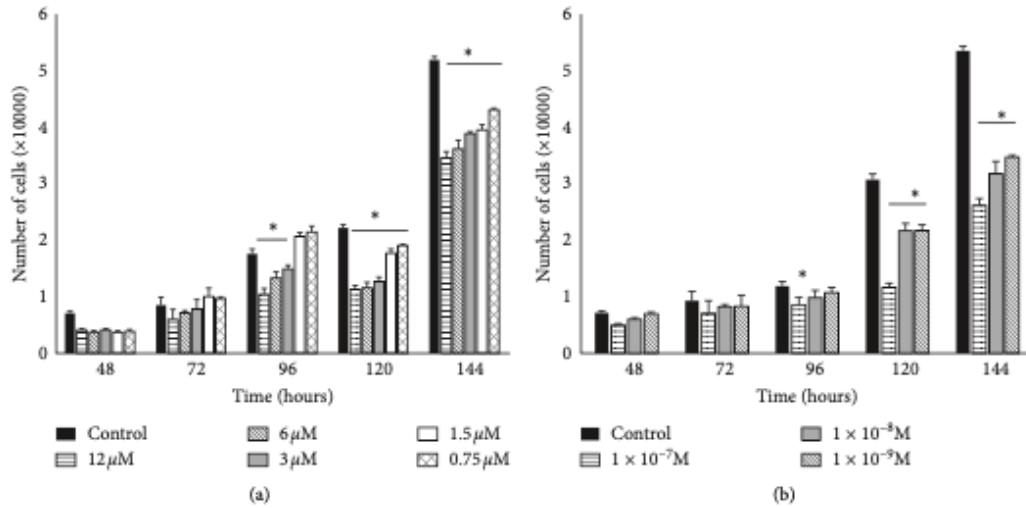
## 10. RESULTADOS

### 10.1 Disminución de la proliferación de hDPSC proporcional a la dosis y tiempo de tratamiento con vitamina D y E

Se caracterizaron las hDPSC y se determinó el perfil de marcadores de células madre mesenquimales (CD73 +, CD90 +, CD105 +, CD14–, CD20–, CD34–, CD45–) (Figura 1a-1e) y la morfología alargada similar a fibroblasto (Figura 1f). Inicialmente, se determinó el efecto del tratamiento con vitamina D o vitamina E administrada individualmente, sobre la proliferación de hDPSC en diferentes momentos. El tratamiento de hDPSC con vitamina E redujo significativamente la proliferación celular en todas las dosis después de 120 h de tratamiento, con una disminución máxima del 31% observada con la concentración más alta (12  $\mu$ M) (Figura 2a). Por el contrario, la vitamina D, a una dosis de  $1 \times 10^{-7}$  M, indujo una proliferación celular significativamente menor después de 96 h. Después de 120 h, todas las concentraciones de tratamiento indujeron una disminución significativa en el número de células, observándose la mayor disminución de la proliferación celular (53%) en las células tratadas con vitamina D a  $1 \times 10^{-7}$  M en comparación con la proliferación en el grupo no tratado (control) (Figura 2b). No se observó muerte celular evidente en los grupos experimentales tratados con vitamina D o E en diferentes tiempos de tratamiento.



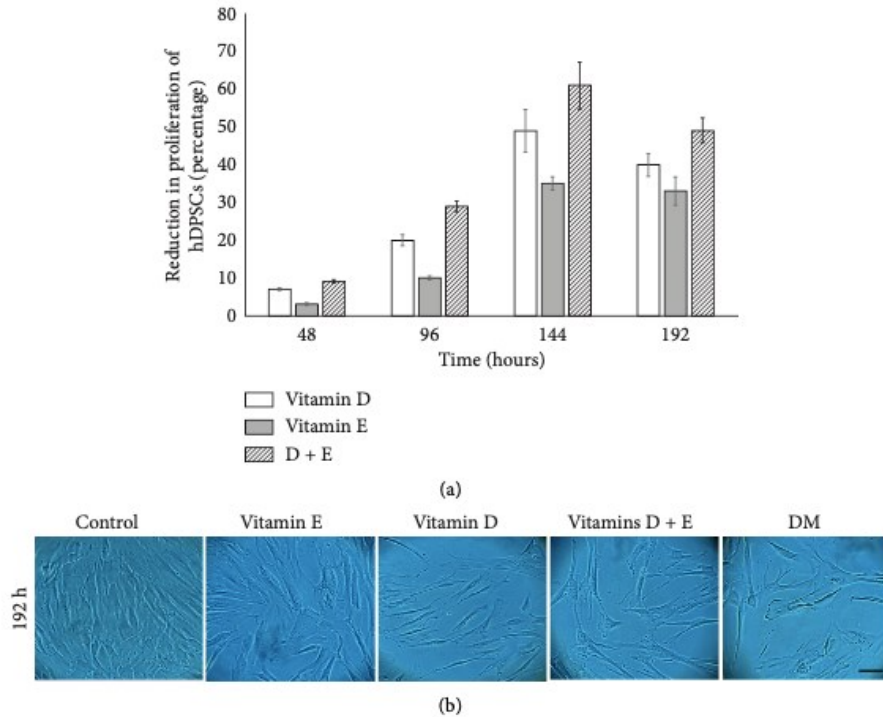
**Figura 1.** Caracterización de hDPSCs. Histogramas de citometría de flujo de dos cultivos primarios de hDPSC con marcadores de superficie positivos para (a) CD105, (b) CD90 y (c) CD73 y (d) negativos para CD34, CD14, CD20 y CD45. (e) Porcentaje de células positivas para cada anticuerpo. El 95% de las células fueron positivas para CD73 y CD90, y menos del 2% fueron positivas para CD34, CD45, CD14 y CD20. (f) Microfotografía de hDPSC con fenotipo de fibroblasto, 7 días después del cultivo. Los valores se presentan en promedios y desviaciones estándar (DE), de dos experimentos independientes. Barra de 200  $\mu$ m.



**Figura 2:** Reducción del número de hPSC inducidas por el tratamiento con diferentes dosis de vitaminas D y E (a). La vitamina E produjo una disminución en el número de células directamente proporcional a la concentración utilizada. Se observaron diferencias significativas a partir de las 96 h con dosis de 12, 6 y 3 μM en comparación con el grupo de control. (b) El tratamiento con vitamina D redujo el número de hPSC en todas las dosis utilizadas después de 120 h en comparación con el grupo de control. Los asteriscos muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los datos se expresan como promedios  $\pm$  DSSD.

## 10.2 El tratamiento simultáneo con vitaminas D y E indujo una mayor disminución de la proliferación celular que la observada con aplicaciones individuales

Dado que  $1 \times 10^{-7}$  M de vitamina D y  $12 \mu\text{M}$  de vitamina E indujeron los mayores cambios en la proliferación y morfología de las hPSCs durante los diferentes tiempos, estas dosis fueron elegidas para ser utilizadas en el tratamiento simultáneo con las dos vitaminas. El tratamiento con vitamina D ( $1 \times 10^{-7}$  M), vitamina E ( $12 \mu\text{M}$ ) y vitaminas D + E disminuyó la proliferación en un 49%, 35% y 61%, respectivamente, después de 144 h, y en un 40%, 33% y 49%, respectivamente, después de 192 h de tratamiento, sin que se observara muerte celular evidente en los grupos experimentales. La administración simultánea de vitaminas D + E redujo significativamente el número de células ( $p < 0.05$ ) en el grupo de control, así como en los grupos tratados individualmente con vitaminas D y E (Figura 3a). Los cultivos celulares tratados al mismo tiempo con vitaminas D y E (D + E) demostraron una menor confluencia celular, con un citoplasma más grande y plano. En contraste, las células tratadas con vitamina D presentaron una morfología más alargada (Figura 3b).

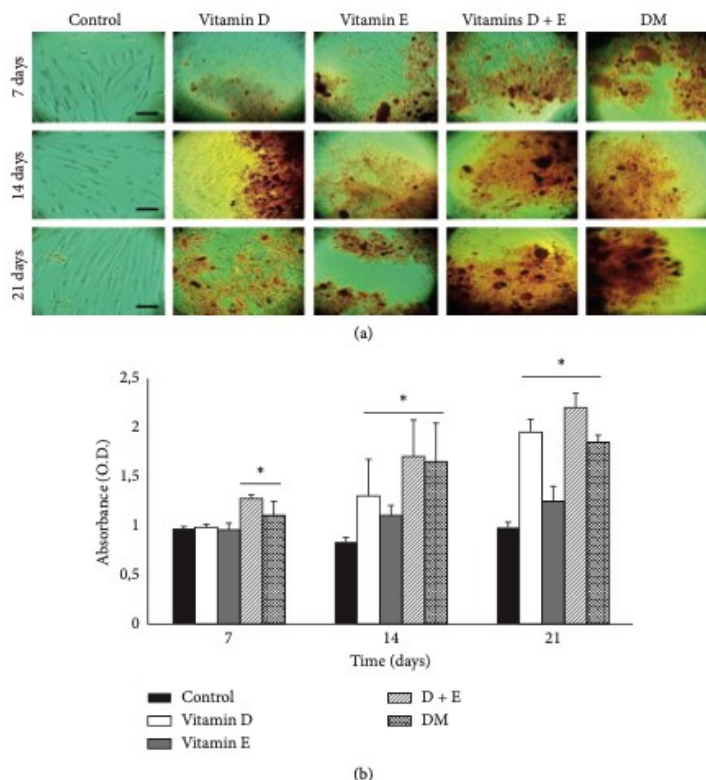


**Figura 3:** Cambios en la proliferación y morfología de hDPSC inducidos por el tratamiento con vitaminas D y E. (a) Reducción porcentual de la proliferación inducida por el tratamiento con vitamina D (10-7M), vitamina E (12  $\mu$ M) y las dos vitaminas simultáneamente ( D + E) durante 192 h de tratamiento. Se puede observar una mayor reducción de la proliferación de células tratadas con vitamina D + E (61% a las 144 y 49% a las 192 h) frente a la observada al aplicar vitamina D (49% a las 144 y 40% a las 192 h) y vitamina E (35% a las 144 h y 33% a las 192 h) individualmente. Todos los grupos de tratamiento mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos y con el control a partir de las 96 h ( $p < 0,05$ ). (b) Microfotografía de hDPSC tratada con vitamina D, vitamina E y vitaminas D + E y medio de diferenciación (DM) durante 192 h. Las células tratadas con vitaminas D y E simultáneamente (D + E) presentaron menos confluencia celular con un citoplasma más grande y plano. Barra de 200  $\mu$ m.

### 10.3 El tratamiento con vitaminas D y E condujo individual y simultáneamente a la diferenciación osteoblástica de las hDPSC.

Para evaluar la actividad osteoblástica, la tinción con rojo de alizarina S determinó la formación de nódulos calcificados en células tratadas con vitaminas D, E y D + E durante 7, 14 y 21 días (Figura 4). Después de 7 días, la formación inicial de nódulos calcificados en células tratadas con vitaminas D + E fue mayor que la observada en las células tratadas individualmente con las vitaminas (Figura 4a, 7 días). A los 14 días, se asoció un aumento significativo en la formación de nódulos calcificados con el tratamiento con vitamina D en comparación con el observado a los 7 días (Figura 4a, 14 días). Además, en todos los grupos experimentales, se observó un aumento en el número de nódulos calcificados a los 21 días (Figura 4a, 21 días). Al cuantificar la absorbancia del rojo de alizarina S extraído de las células, se observaron diferencias significativas a los 7 días entre las células tratadas con

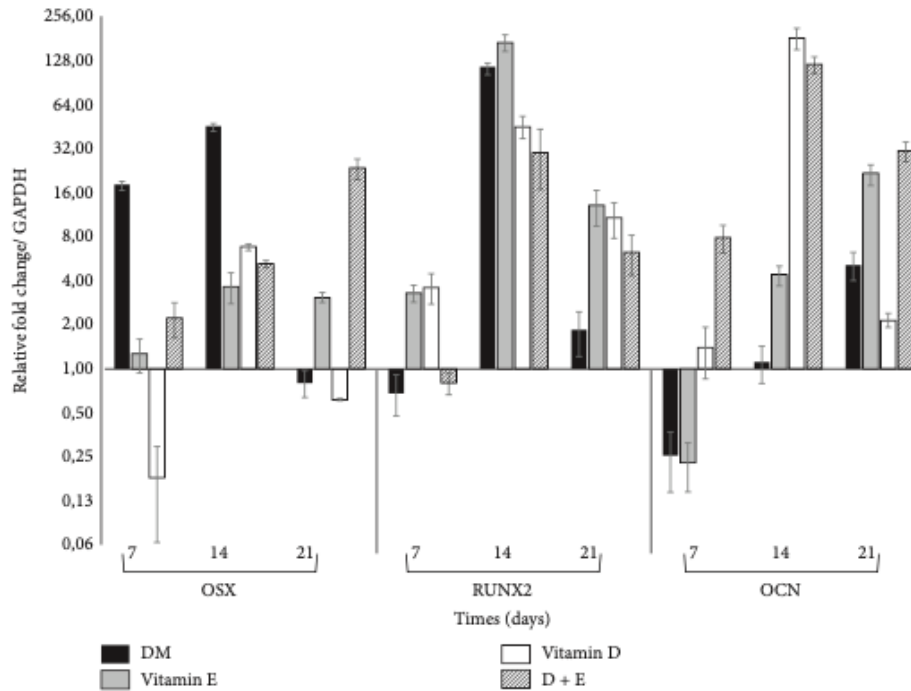
vitaminas D + E y la DM en comparación con el grupo control. A los 14 y 21 días, se observó un aumento significativo en la cantidad de rojo de alizarina S en todos los grupos experimentales en relación con el grupo de control (Figura 4b).



**Figura 4:** Mineralización de la matriz extracelular. (a) La mineralización se determinó mediante tinción con rojo de alizarina. Se observó una fuerte tinción de la matriz en las microfotografías, lo que indicó la aparente formación de nódulos de calcificación. (b) Medición de la absorbancia (densidad óptica, DO) de la tinción roja de alizarina extraída de células bajo diferentes tratamientos a los 7, 14 y 21 días. Medio de diferenciación (DM). Los asteriscos muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control. Los datos se expresan como promedios  $\pm$  DE. Barra de 200  $\mu$ m.

Para comprender el papel de las vitaminas D y E en la diferenciación de osteoblastos, comparamos sus efectos sobre la expresión de marcadores osteoblásticos mediante análisis de PCR en tiempo real. Después de 14 días de tratamiento, se observó una mayor expresión del gen OSX en todos los grupos experimentales; posteriormente, fue evidente la disminución de la expresión, excepto en el grupo tratado simultáneamente con las dos vitaminas (vitaminas D + E), en el que la expresión de OSX continuó aumentando (Figura 5). Por el contrario, después de 14 días, la expresión de RUNX2 aumentó significativamente en todos los grupos experimentales. Además, el tratamiento con vitamina E produjo el mayor aumento observado a los 14 días (164 veces). A los 21 días, la expresión de RUNX2 disminuyó en todos los grupos (Figura 5). Finalmente, el gen OCN demostró una mayor expresión en todos los grupos experimentales a los 14 días. Posteriormente, la expresión

de OCN disminuyó después de 21 días en el grupo de vitamina D, así como en el grupo tratado simultáneamente con las dos vitaminas (D + E). Después de 21 días de tratamiento, los grupos de células tratados con DM y vitamina E demostraron un aumento en la expresión del gen OCN (Figura 5).



**Figura 5:** Cuantificación de la expresión génica relativa durante la diferenciación: se realizó la cuantificación de la expresión relativa de osteoblastos específicos y transcripciones mineralizantes del factor de transcripción 2 relacionado con el enrojecimiento (RUNX2), Osterix (OSX) y Osteocalcina (OCN) en hDPSC tratadas con vitamina D, E y D + E durante 7, 14 y 21 días. Los datos se expresan en relación a los niveles de expresión del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y como control positivo, y se analizaron las células tratadas con medio de diferenciación (DM).

## 11. DISCUSIÓN

El movimiento dental mediado por la ortodoncia depende de la remodelación de los tejidos que rodean los dientes después de la aplicación de fuerzas mecánicas. Para que se produzca el movimiento dental, es fundamental la aplicación de fuerzas mecánicas capaces de activar el hueso y las células relacionadas generando cambios inflamatorios en el tejido periodontal, desencadenando el movimiento dental deseado. Actualmente, se están investigando métodos para acelerar el movimiento, utilizando algunos métodos invasivos como osteotomías, corticotomías y otros, como piezoincisiones y microosteoperforaciones. Además, se han explorado métodos mecánicos como vibración y láseres y productos químicos de baja frecuencia, incluida la aplicación de prostaglandinas, hormonas, opioides y vitaminas. (Gkantidisa et al, 2014)

La vitamina D es una de las vitaminas investigadas para acelerar movimiento dental y es un poderoso regulador del desarrollo y metabolismo óseo, participando en la homeostasis del calcio y aumentando significativamente la formación ósea en el área reabsorbida del hueso alveolar después del movimiento dentario. Después del tratamiento de ortodoncia, la vitamina D puede promover la restauración del tejido de soporte de los dientes (Kouskoura, 2004). Además, se ha determinado que la vitamina D, en su forma activa, desempeña un papel particularmente importante en el tejido óseo, ya que puede estimular tanto la formación como la reabsorción ósea, regulando el recambio óseo y actuando tanto sobre osteoblastos como sobre osteoclastos (Collins and Sinclair, 1988). En particular, la interacción entre la vitamina D y los osteoblastos es compleja. La presencia del receptor de vitamina D en los osteoblastos permite efectos directos, pero estos efectos varían con la dosis y el tiempo de tratamiento y el origen de los osteoblastos. El efecto de la vitamina D sobre la diferenciación y mineralización es principalmente estimulante en osteoblastos humanos y de rata e inhibidor en osteoblastos murinos.

Aunque la mayoría de las investigaciones indican un efecto inductor de los osteoclastos y osteoblastos, algunos estudios han sugerido que la principal acción farmacológica in vivo de la vitamina D, al menos en un estado elevado de recambio óseo, como la deficiencia de estrógenos, es suprimir la resorción ósea osteoclástica (Shibata, 2002). Esto induce a la incertidumbre con respecto al papel que desempeña la vitamina D en la resorción ósea o la deposición y mineralización alrededor del diente sometido a movimiento de ortodoncia. En el presente estudio, las hDPSC tratadas con la vitamina D demostraron una disminución significativa de la proliferación dependiente de la dosis. La disminución en el número de células fue significativa con el tratamiento con vitamina D  $1 \times 10^{-7}$  M a partir de las 96 h; a las 120 h, todas las concentraciones de tratamiento ( $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-7}$  M) indujeron una disminución significativa en el número de células. Este número reducido de

células está asociado con una disminución en la proliferación celular ya que no se observó muerte celular evidente en ningún grupo experimental. Del mismo modo, Atkins et al. han demostrado que La  $1\alpha$ -25-dihidroxitamina D3 (1,25-D3), un importante metabolito de la vitamina D, reduce considerablemente la tasa de proliferación celular a una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  M, lo que indica que es un importante regulador fisiológico de la proliferación de osteoblastos humanos (Atkins,2007). Ji y col. han empleado experimentos in vitro para aclarar cómo la 1,25-D3 induce la diferenciación osteogénica en las células madre del ligamento periodontal humano, notando una disminución en proliferación celular en comparación con el grupo de control a diferentes concentraciones (0,01, 1 y 10 nM) después de 24, 48 y 72 h (Zang,2018). Wang y col. han investigado el efecto de 1,25-D3 (0,01 y 0,02 nmol / L) sobre los osteoblastos durante 7 a 14 días y han informado de un aumento significativo en la viabilidad de los osteoblastos; sin embargo, dependiendo de la dosis administrada, los resultados variaron y no lograron producir una diferenciación celular significativa ( O'Loughlin,2018).

A diferencia de los hallazgos anteriores, otro estudio que utilizó células MC3T3-E similares a los osteoblastos tratados con concentraciones de vitamina D  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-12}$  y  $1 \times 10^{-14}$  M para inhibir el crecimiento celular, demostraron una tasa de proliferación mayor que es observado en el grupo de control en todas las concentraciones. Sin embargo, se observó un aumento en la expresión de marcadores asociados con la diferenciación celular (Kim,2018). Por tanto, los efectos de la vitamina D dependen directamente de las dosis administradas, induciendo la diferenciación osteogénica de las células madre; sin embargo, dependiendo del medio, la concentración y el tipo de células pueden producir o no una disminución considerable de la proliferación celular.

En cuanto al efecto de la vitamina E sobre la proliferación de células mesenquimales in vitro, este estudio encontró una reducción significativa en el número de células en todas las dosis utilizadas (de 0,31  $\mu$ g / ml a 5  $\mu$ g / ml), a partir de las 120 horas de tratamiento. Los estudios sobre los cambios en la proliferación celular inducidos por el tratamiento con vitamina E son contradictorios: Fujita et al, evaluaron la acción de la vitamina E en ratones que tenían una deficiencia en la proteína de transferencia de  $\alpha$ -tocoferol, comparándola con un modelo de ratón salvaje, encontrando que los osteoblásticos la diferenciación y la proliferación no se alteraron con el tratamiento con vitamina E (( O'Loughlin,2018). Adicionalmente, Urban et al, encontraron en su estudio in vitro que no se genera un aumento en la proliferación de osteoblastos luego de la aplicación de vitamina E, sin embargo, argumentan que altas dosis de esta vitamina pueden generar efectos tóxicos previniendo su diferenciación y proliferación(Kim, 2018). Por otro lado, Ahn et al. encontraron que la proliferación de células madre mesenquimales humanas (MSC) aumentaba después de la incubación con  $\alpha$ Tocoferol (vitamina E) (Fujita,2012). En un



estudio desarrollado por Wan Hasan et al, células preosteoblásticas MC3T3-E1 tratadas con un derivado de vitamina E: tocotrienol derivado de annatto, en dosis de 5, 10 y 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$  después de 3 a 6 días de tratamiento, dieron una reducción significativa de la cantidad de células, además se observó no solo proliferación sino también en la viabilidad celular (Wang,2018). En nuestro estudio, el tratamiento con vitamina E no produjo una reducción en la cantidad de células vivas en ninguna de las dosis utilizadas.

También se evaluaron los cambios morfológicos de las células tratadas con Vitamina D y E, observándose menor densidad celular directamente proporcional a la concentración utilizada, células con mayores extensiones y citoplasma poligonal con mayor tamaño citoplasmático. Estos cambios son similares a los informados por Wan Hasan et al, que detectaron cambios morfológicos en las células preosteoblásticas MC3T3-E1 desde el tercer día de tratamiento con un derivado de la vitamina E, convirtiéndose en células más cúbicas y más grandes que las células de control (Wan, 2018- Urban,2012). Adicionalmente, Kanna-Jain et al, determinaron que, a nivel morfológico, la vitamina D induce la proliferación de células de la pulpa y del folículo dentario con morfología triangular, estrellada o fusiforme, ambas en un tiempo aproximado de 1-2 semanas y posteriormente una estructura similar a una red (Kanna,2011). Por su parte, Lou et al, probaron la hipótesis de que la  $1\alpha, 25$ -dihidroxitamina D3 juega un papel fundamental en presencia de cambios morfológicos en células mesenquimales, en la que se evidenció que las células cultivadas a menor densidad en crecimiento medio normal parecían más grandes, más planas y fusiformes, mientras que a mayor densidad luego de un cultivo de 21 días se veían más como fibroblastos y dependiendo de la dosis administrada, en este caso 500nM, algunas células comenzaron a tener cambios significativos después de 6 días, adquiriendo una mayor forma poligonal, una característica asociada con las células osteoblásticas y alrededor de los 16 días llegando a formar una población más homogénea (Urban, 2012).

Actualmente, no existen estudios que evalúen la acción combinada de la Vitamina D y la Vitamina E en la diferenciación de células mesenquimales, por lo que es importante realizar este tipo de investigaciones para poder determinar con mayor precisión su mecanismo de acción y como en el futuro se pueden utilizar terapéuticamente. En este estudio se encontró que el tratamiento con Vitamina D + E indujo una reducción en la proliferación del 49% a los 8 días de tratamiento (192h) que fue mayor que la encontrada al aplicar las dos vitaminas individualmente. También se observaron cambios morfológicos con el tratamiento simultáneo con las dos vitaminas, encontrándose células más grandes y poligonales con marcadas extensiones citoplasmáticas. En cuanto al efecto que producen estas vitaminas en la diferenciación osteoblástica y en la estimulación del proceso de mineralización in vitro, se observó formación de nódulos de mineralización tras la tinción con rojo de alizarina, siendo su formación mayor en células tratadas de forma combinada

con ambas vitaminas, en comparación con grupo tratado individualmente y con el control. La extracción de rojo de alizarina de las células generó un mayor contenido de colorante en las células tratadas con las dos vitaminas aplicadas simultáneamente.

Las células tratadas con Vitamina D mostraron un aumento significativo en la formación de nódulos de calcificación a los 14 días de tratamiento. De forma similar, De Kok et al, determinaron que esta vitamina induce la diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimales humanas cultivadas por un período de 14 a 21 días, encontrando una mayor formación de nódulos de mineralización después de este tiempo (Lou, 2017). Además, Khanna-Jain informó que las células madre de la pulpa y los folículos formaban una matriz mineralizada cuando se trataban con metabolitos de vitamina D3 (Ahn, 2011). En el estudio de Mojarad et al, la tinción con rojo de alizarina mostró que el tratamiento con  $1\alpha, 25$  (OH)  $2D_3$  inducía una mayor formación de nódulos mineralizados (Khanna, 2010). Por otro lado, Ji et al, demostraron en su estudio que después de 14 días de tratamiento con vitamina D, las células mesenquimales del ligamento periodontal humano generaron una mayor formación de nódulos mineralizados que el grupo de control (Zhang, 2018). La vitamina E también produjo un aumento en la formación de nódulos de calcificación similar al observado con el tratamiento con vitamina D. Wan Hasan et al encontraron resultados similares en células MC3T3-E1 tratadas con diferentes concentraciones de vitamina E donde la intensidad de la tinción positiva para el rojo de alizarina aumentó del día 3 al día 21 en todos los grupos experimentales (Wan, 2018).

Para comprender el papel de las vitaminas D y E en la osteogénesis, se comparó su efecto sobre la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica. La vitamina D indujo un aumento en la expresión de genes de diferenciación celular como RUNX2, OSX y OCN a las 14 h de tratamiento y una disminución en su expresión a los 21 días. Curtis et al informaron resultados similares, quienes determinaron que la expresión de OCN aumentó significativamente principalmente en el día 14 del tratamiento con vitamina D en células madre mesenquimales humanas tratadas con vitamina D3 10 nM (De Kok, 2006). Por otro lado, Posa et al, determinaron que la expresión de RUNX2 aumentó significativamente a los 7 y 14 días, disminuyendo después de 21 días de tratamiento con vitamina D en células madre derivadas de la yema dentaria (DBSC) (Mojarad, 2016). Nuestros resultados difieren de los obtenidos por Kim et al, quienes encontraron cambios tempranos en la expresión de ALP, Col-I, VDR y OCN en células MC3T3-E1 tratadas con  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-12}$  y  $1 \times 10^{-14}$  M de 1,25- dihidroxivitamina D3 (Atkins, 2007). Estas diferencias pueden deberse al rango de dosis y al tipo de células analizadas. Además, Wan Hasan et al, en su estudio, encontraron que genes como OSX, COL1 $\alpha$ 1, ALP y OCN, aumentaron significativamente en células tratadas con un derivado de vitamina D AnTT desde el día 3 al día 15 de tratamiento (Wan, 2018).

En relación a la Vitamina E, existen pocos estudios que evalúen la expresión de diferentes genes implicados en la diferenciación osteogénica, debido al escaso conocimiento de su mecanismo de acción y a la falta de consenso sobre la dosis adecuada en el momento de su aplicación para la producción de efectos terapéuticos. En el presente estudio encontramos un aumento en la expresión del gen OSX y RUNX2 a los 14 días debido al tratamiento con Vitamina E y una reducción a los 21 días de tratamiento. Por su parte, la OCN aumentó a los 14 días y se mantuvo elevada a los 21 días de tratamiento. En el estudio realizado por Ahn et al, se evaluaron 68 genes implicados en la osteogénesis y osteoclastogénesis durante la diferenciación de células madre mesenquimales tratadas con Vitamina E, dentro de las cuales se encontró RUNX2 y se determinó un aumento de 1,5 veces en la expresión de este gen tras tratamiento con vitamina E, concluyendo que la vitamina E tiene un efecto positivo en la expresión de genes de diferenciación osteogénica en células madre mesenquimales (Fujita, 2012). Por otro lado, Wan Hasan et al, determinaron que el tratamiento con un derivado de Vitamina E inducía un aumento en la expresión de genes de diferenciación osteoblástica como OSX, COL1 $\alpha$ 1, ALP y OCN, dependiendo del tiempo de tratamiento (Wan, 2018).

Al combinar Vitamina D y E encontramos una reducción de la proliferación celular (49%) mayor a la observada con tratamientos individuales y cambios morfológicos evidentes, observándose células más grandes y con mayores prolongaciones. Junto a estos resultados encontramos un leve aumento en la formación de nódulos de calcificación cuando las dos vitaminas se aplican simultáneamente, lo que se asoció a un aumento en la expresión de genes marcadores de osteoblastogénesis como RUNX2, OSX, OCN, lo que puede sugerir una sinergia y efecto no aditivo en la inducción de la diferenciación osteoblástica en células madre mesenquimales. No hay informes en la literatura sobre el efecto de la aplicación simultánea de vitamina D y E en las células mesenquimales. Hasta ahora, se han realizado comparaciones de la vitamina A y D en el estudio de Bosetti et al, quienes determinan que las células similares a los osteoblastos pueden responder a estímulos que inducen la diferenciación en cualquier etapa de su vida; sin embargo, no evalúan el uso simultáneo de las dos vitaminas (Curtis, 2014). Además, Gigante et al, encontraron en su estudio que la vitamina K aplicada sola o en combinación con vitamina D en las células madre mesenquimales induce la diferenciación celular. La combinación de ambas vitaminas genera un efecto sinérgico en la diferenciación de estas células madre hacia osteoblastos (Posa, 2016).

## **12. CONCLUSIONES**

1. Nuestros hallazgos sugieren que la vitamina D y E inducen la diferenciación osteoblástica de las células hDPSC evidenciada por la reducción de la proliferación celular, cambios morfológicos, formación de nódulos de calcificación y aumento en la expresión de genes de diferenciación como RUNX2, OSX, OCN.
2. El tratamiento simultáneo con vitamina D + E induce un efecto sinérgico en la diferenciación hacia el linaje osteoblástico.

### 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahn KH, Jung HK, Jung SE, Yi KW, Park HT, Shin JH, Kim YT, Hur JY, Kim SH, Kim T. Microarray analysis of gene expression during differentiation of human mesenchymal stem cells treated with vitamin E in vitro into osteoblasts. *Korean J Bone Metab.* 2011; 18(1):23-32.
2. Atkins G.J., Anderson P.H., Findlay D.M., Welldon K.J., Vincent C., Zannettino V. D.O'Loughlin P., Morris H.A. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of 1 $\alpha$ ,25- dihydroxyvitamin D3. *Bone* 2007; 40(6): 1517-1528.
3. Alikhani M., Raptis M., Zoldan B., Sangsuwon C., Lee YB., Alyami B., Corpodian C., Barrera LM., Alansari S., Khoo E., Teixeira C. Effect of micro- osteoperforations on the rate of tooth movement. *AJODO* 2013;144(5):639-48.
4. Arévalo JA., Páez DM., Rodríguez VM. Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *NOVA* 2007;5 (8):101-212.
5. Arbósa A. Nicolau F. Quetglas M. Ramis JM. Monjob M. Muncunill J. Calvo J. Gayà A. Obtención de células madre mesenquimales a partir de cordones umbilicales procedentes de un programa altruista de donación de sangre de cordón. *Inmunología* 2013; 32 (1): 3-11.
6. Arias OR and Marquez-Orozco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: Their effects on orthodontic tooth movement. *AJODO* 2006;130:364-70.
7. Aristizábal J. Accelerated orthodontics and express transit orthodontics(ETO)<sup>®</sup>, a contemporary concept of high efficiency. *CES Odontol* 2014;27(1):56–73.
8. Atkins, G. J., Anderson, P. H., Findlay, D. M., Welldon, K. J., Vincent, C., Zannettino, A. C. W., Morris, H. A. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of 1,25- dihydroxyvitamin D3. *Bone.* 2007; 40(6): 1517–1528.
9. Azzi A. Many tocopherols, one vitamin E. *Mol Aspects Med.* 2017; S0098- 2997(17): 30041-9.
10. Baldock PA., Thomas GP.,Hodge JM., Baker SUK., Dressel U., DO'Loughlin P., Nicholson GC., Briffa KH., Eisman JA., and Gardiner EM. Vitamin D Action and Regulation of Bone Remodeling: Suppression of Osteoclastogenesis by the Mature Osteoblast. *Journal of Bone and Mineral Research* 2006; 21(10): 1618- 1626.
11. Bartzela T., Türp JC., Motschall E., Maltha JC., Camacho, A.D., and Cujar, S.A.V. Dental movement acceleration: Literature review by an alternative scientific evidence method. *World Journal of Methodology* 2014; 4(3):151–162.
12. Bolland MJ, Avenell A, Baron JA, Grey A, MacLennan GS, Gamble GD, Reid IR. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *BMJ.* 2010; 29(341):c3691.
13. Bosetti M, Sabbatini M, Calarco A, Borrone A, Peluso G, Cannas M. Effect of retinoic acid and vitamin D3 on osteoblast differentiation and activity in aging. *J Bone Miner Metab.* 2016 Jan;34(1):65-78.

14. Collins MK and Sinclair PM. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 1988; 94:278-84.
15. Curtis KM, Aenlle KK, Roos BA, Howard GA. 24R,25-dihydroxyvitamin D3 promotes the osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mol Endocrinol*. 2014 May;28(5):644-58.
16. Chin KY, Ima-Nirwana S. The biological effects of tocotrienol on bone: a review on evidence from rodent models. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Apr 8; 9:2049-61.
17. Davidovitch Z. Biological mechanisms of tooth movement, cap 2, 2014: 19 - 39.
18. De Kok IJ, Hicok KC, Padilla RJ, Young RG, Cooper LF. Effect of vitamin D pretreatment of human mesenchymal stem cells on ectopic bone formation. *J Oral Implantol*. 2006;32(3):103-9.
19. Dibart S., Sebaoun JD., Surmenian J. Piezocision: a minimally invasive, periodontally accelerated orthodontic tooth movement procedure. *Compend Contin Educ Dent*. 2009; 30(6):342-4, 346, 348-50.
20. Diravidamani K., Sivalingam SK and Agarwal V. Drugs influencing orthodontic tooth movement: An overall review. *J Pharm Bioallied Sci* 2012; 4(Suppl 2): S299– S303.
21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D *et al*. Minimal criteria for Refining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.
22. Doshi-Mehta G and Bhad-Patil WA. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. *AJODO* 2012;141(3):289-97.
23. Ebina Y., Okada S., Hamazaki S., Toda Y. and Midorikawa O. Impairment of bone formation with aluminum and ferric nitrilotriacetate complexes. *Calcif. Tissue Int*. 1991; 48: 28–36.
24. Escobar L, Aristizábal FA. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae, Rev Fac Química Farmacéutica*. 2010;17(2):173-80.
25. Flores-Figueroa E, Monasterios JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Rev Invest clín*. 2006; 58(5):498-511.
26. Frost H. The regional acceleratory phenomenon: a review. *Henry Ford Hosp Med J*. 1983; 31(1): 3-9.
27. Fuentes MF. Optimización del sistema de cultivo y caracterización de células madre mesenquimales obtenidas a partir de médula ósea humana. [Tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias; 2008.

28. Fujita K., Iwasaki M., Ochi H., Fukuda T., Ma C., Miyamoto T. Takeda S. Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion. *Nature Medicine* 2012; 18(9): 1445–1445.
29. Geng S, Zhou S, Bi Z, Glowacki J. Vitamin D metabolism in human bone marrow stromal (mesenchymal stem) cells. *Metabolism* 2013;62(6):768–77.
30. Gigante A, Torcianti M, Boldrini E, Manzotti S, Falcone G, Greco F, Mattioli- Belmonte M. Vitamin K and D association stimulates in vitro osteoblast differentiation of fracture site derived human mesenchymal stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2008 Jan-Mar;22(1):35-44.
31. Gkantidisa N. Mistakidis I. Pandisa N. Effectiveness of non-conventional methods for accelerated orthodontic tooth movement: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry*. 2014; 42(10): 1300-1319.
32. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, Denbesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81: 531-535.
33. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010 39(2):365-79. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL and Khosla S. Osteoprotegerin Production by Human Osteoblast Lineage Cells Is Stimulated by Vitamin D, Bone Morphogenetic Protein-2, and Cytokine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 250(3):776-81.
34. Holick MF. Vitamin D and sunlight: strategies for cancer prevention and other health benefits. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008b 3(5):1548- 54.
35. Huang GT., Gronthos S., Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009; 88(9):792–806.
36. Ji Y, Zhang P, Xing Y, Jia L, Zhang Y, Jia T, Wu X, Zhao B, Xu X. Effect of  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells and the underlying regulatory mechanism. *Int J Mol Med*. 2019 Jan;43(1):167-176.
37. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti- inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014; 72: 76–90.
38. Kale S, Kocadereli I, Atilla P and Asan E. Comparison of the effects of  $1,25$  dihydroxycholecalciferol and prostaglandin E<sub>2</sub> on orthodontic tooth movement. *AJODO* 2004; 125:607-14.

39. Khanna-Jain R, Vuorinen A, Sándor GK, Suuronen R, Miettinen S. Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 122: 133-141.
40. Kawakami M and Takano-Yamamoto T. Local injection of 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhanced bone formation for tooth stabilization after experimental tooth movement in rats. *J Bone Miner Metab* 2004; 22:541–546.
41. Kim HS, Zheng M, Kim DK, Lee WP, Yu SJ, Kim BO. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the differentiation of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Periodontal Implant Sci.* 2018 Feb 27;48(1):34-46.
42. Kulie T., Groff A., Redmer J, Hounshell J and Schrage S. Vitamin D: An Evidence-Based Review. *J Am Board Fam Med* 2009;22:698–706.
43. Liu P., Feng Y., Dong C., Liu D., Wu X., Wu H., ... Zhou Y. Study on therapeutic action of bone marrow derived mesenchymal stem cell combined with vitamin e against acute kidney injury in rats. *Life Sciences.* 2013; 92(14–16): 829–837.
44. Long H., Pyakurel U., Wang Y., Liao L., Zhou Y., and Lai W. Interventions for accelerating orthodontic tooth movement: a systematic review. *The Angle Orthodontist*, 2012; 83(1): 164-171.
45. Lou YR, Toh TC, Tee YH, Yu H. 25-Hydroxyvitamin D(3) induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2017 Feb 17; 7:42816.
46. Mehat MZ., Shuid AN., Mohamed N., Muhammad N., Soelaiman IN. Beneficial effects of vitamin E isomer supplementation on static and dynamic bone histomorphometry parameters in normal male rats. *J Bone Miner Metab.* 2010; 28(5):503-9
47. Mérida I. Movimiento Ortodóntico y sus factores modificantes, Revisión bibliográfica. *Rev Latinoam Ortod y Odontopediatría.* 2011;1–23.
48. Mojarad F, Amiri I, Rafatjou R, Janeshin A, Farhadian M. The Effect of 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$  on Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Dental Pulp of Exfoliated Deciduous Teeth. *J Dent (Shiraz).* 2016 Dec;17(4):348-353.
49. Muñoz S. Influencia del ambiente sobre la capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales. [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Odontología; 2012.
50. Nimeri G, Kau CH, Abou-Kheir NS and Corona R. Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment - a frontier in Orthodontics. *Progress in Orthodontics.* 2013; 14:42-50.
51. Nishimura M., Chiba M., Ohashi T., Sato M., Shimizu Y., Igarashi K., Mitani H. Periodontal tissue activation by vibration: intermittent stimulation by resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. *AJODO* 2008; 133(4):572-83.




52. Pascher E, Perniok A, Becker A, Feldkamp J. Effect of 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub> on TNF $\alpha$ -Mediated Apoptosis of Human Primary Osteoblast-Like Cells in Vitro. *Horm Metab Res* 1999; 31:653–656
53. Pike JW and Meyer MB. The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010; 39(2): 255–269.
54. Posa F, Di Benedetto A, Colaianni G, Cavalcanti-Adam EA, Brunetti G, Porro C, Trotta T, Grano M, Mori G. Vitamin D Effects on Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Dental Tissues. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9150819. Epub 2016 Nov 13.
55. Raisz LG, Trummel C.L. Holick M.F. 1,25-Dihydroxycholecalciferol: A Potent Stimulator of Bone Resorption in Tissue Culture. *SCIENCE* 1972 175:2–3.
56. Renò F., Aina V., Gatti S., and Cannas, M. Effect of vitamin E addition to poly(d,l)-lactic acid on surface properties and osteoblast behaviour. *Biomaterials*, 2005; 26(28): 5594–5599.
57. Rodríguez-Pardo VM., Fuentes-Lacouture MF., Aristizabal-Castellanos JA., Vernot Hernandez, JP. Aislamiento y caracterización de células "stem" mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientiarum*, 2010; 15(3):224-239.
58. Shetty A., Patilb A.K., Ameet R., Sandhud PK. Local infiltration of Vitamin D<sub>3</sub> does not accelerate orthodontic tooth movement in humans: A preliminary study. *ANGLE ORT*. 2015; 2:1-5.
59. Shibata T., Shira-Ishi A., Sato T., Masaki T., Sasaki A., Masuda Y., Hishiya A., Ishikura N., Higashi S., Uchida Y., Saito M., Ito M., Ogata E., Watanabe K., and Ikeda K. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH Volume 17, Number 4, Vitamin D Hormone Inhibits Osteoclastogenesis In Vivo by Decreasing the Pool of Osteoclast Precursors in Bone Marrow. *Journal of bone and mineral research*. 2002; 17 (4): 622-628.
60. Soeta S., Higuchi M., Yoshimura I., Itoh R., Kimura N., and Aamsaki, H. Effects of vitamin E on the osteoblast differentiation. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*. 2010; 72(7): 951–957.
61. St-Arnaud RA and Demay MB. Vitamin D Biology. *Pediatr Bone*. 2012;163–87. Suda T., Takahashi N., Abe E. Role of vitamin D in bone resorption. *J Cell Biochem*. 1992; 49(1):53-8.
62. Suda T, Ueno Y, Fujii K, Shinki T. Vitamin D and bone. *J Cell Biochem* 2003;88:259-66.
63. Trabera MG and Atkinsonb J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007; 43 (1): 4-15.

64. Urban K., Höhling HJ., Lüttenberg B., Szuwart T., Plate U. An in vitro study of osteoblast vitality influenced by the vitamins C and E. *Head & Face Medicine* 2012; 8:25.
65. Valero-Zanuy MA and Hawkins-Carranza YF. Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *REEMO*. 2007;16(4):63-70.
66. van Driel M and van Leeuwen J. Vitamin D endocrine system and osteoblasts. *BoneKEy Reports*. 2014; 493:1-8.
67. Wang D, Song J, Ma H. An in vitro Experimental Insight into the Osteoblast Responses to Vitamin D3 and Its Metabolites. *Pharmacology*. 2018;101(5-6):225-235.
68. Wan Hasan WN, Abd Ghafar N, Chin KY, Ima-Nirwana S. Annatto-derived tocotrienol stimulates osteogenic activity in preosteoblastic MC3T3-E1 cells: a temporal sequential study. *Drug Des Devel Ther*. 2018 Jun 13;12:1715-1726.
69. Wronski TJ, Halloran BP, Bikle DD, Globus RK, Morey-Holton ER. Chronic administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3; Increased bone but impaired mineralization. *Endocrinology* 1986; 119: 2580–2585
70. White JH. Vitamin D signalling, infectious diseases, and regulation of innate immunity. *Infection and Immunity*. 2008 76(9):3837- 3843.
71. Xu B.A., Watkins M.F., Seifert. Vitamin E Stimulates Trabecular Bone Formation and Alters Epiphyseal Cartilage Morphometry. *Calcif. Tissue International* 1995; 57:293-300.
72. Yamasaki K., Shibata Y., Imai S., Tani Y., Shibasaki Y., Fukuhara T. Clinical application of prostaglandin E1 (PGE1) upon orthodontic tooth movement. *Am J Orthod*. 1984; 85(6):508-18.
73. Zhang R and Naughton D. Vitamin D in health and disease: current perspectives. *Nutr J*. 2010; 9(65):1-13.

## 14. ANEXOS

### 14.1 Anexo 1: Acta de aprobación Comité Institucional de Ética en Investigación Universidad El Bosque

<p>***</p> <p><b>COMUNICACIÓN INTERNA</b></p> <p>Comité Institucional de Ética en Investigación</p>	 <p><b>UNIVERSIDAD EL BOSQUE</b> Por una cultura de la vida, su calidad y su sentido</p>
<p><b>MIEMBROS</b></p> <p><b>NADIA YADIRA CASTAÑEDA G.</b> Lic. Biología y Química MSc. cPhD. Biotecnología Investigadora Presidente</p> <p><b>EDGAR ORLANDO BELTRAN Z.</b> Odontólogo MSc en Ciencias Básicas Biomédicas Experto en Metodología de la Investigación Secretario Ejecutivo</p> <p><b>DIANA MARCELA BUITRAGO R.</b> Bacterióloga PhD Ciencias Farmacéuticas Experta en Metodología de la Investigación</p> <p><b>MIGUEL ANTONIO SÁNCHEZ C.</b> Enfermero Magister en Administración en Salud cPhD Bioética Experto en Bioética</p> <p><b>MARIA DEL PILAR OLAYA O.</b> Química Farmacéutica. MSc en Toxicología cPhD Ciencias Farmacéuticas Farmacóloga</p> <p><b>LINA ROCIO GUTIERREZ T.</b> Abogada Especialista en Derecho Administrativo, Derecho Procesal y Derecho Probatorio Abogada</p> <p><b>MARIA CRISTINA MEJÍA G.</b> Psicóloga Representante de la Comunidad.</p> <p><b>AMÉD FERNANDO VERGARA</b> Ingeniero Agrícola Especialista en Gerencia de Proyectos. Representante de la Comunidad</p>	<p>Bogotá, D.C., 23 de mayo de 2018</p> <p>Doctor <b>MIGUEL OTERO CADENA</b> Vicerrector de Investigaciones <b>UNIVERSIDAD EL BOSQUE</b> Bogotá</p> <p>Proyecto: "Efecto de la vitamina D y E en la proliferación, viabilidad y diferenciación de células mesenquimales <i>in vitro</i>".</p> <p>Cód.: PCI 2017 - 9551</p> <p>Investigador Principal: Lina María Escobar</p> <p>Respetado Doctor Otero:</p> <p>Estamos informando que el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad El Bosque, en la sesión extraordinaria del 15 de mayo de 2018, Acta No. 013-2018, con los miembros citados a la izquierda, quienes cumplían el quórum revisó y aprobó el proyecto en referencia, ya que se hicieron las correcciones solicitadas.</p> <p>Investigación con Riesgo mínimo.</p> <p>El investigador principal deberá enviar el Informe de seguimiento en el mes de diciembre de 2018 y el Informe final en el mes de julio de 2019.</p>