



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA DE CMNSP FUSIONADAS CON POLIETILENGLICOL (PEG), TRATADAS CON FUERZA CENTRÍFUGA Y CON N ACETILCISTEINA (NAC)

**Presentado por:
Juan Sebastián Bedoya Trujillo**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Odontología.

Posgrado de Ortodoncia

Bogotá D.C. Colombia

2015

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA DE CMNSP FUSIONADAS CON POLIETILENGLICOL (PEG), TRATADAS CON FUERZA CENTRÍFUGA Y CON N ACETILCISTEINA (NAC)

Juan Sebastián Bedoya Trujillo

**Trabajo de investigación presentado para optar al título de:
Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar**

**Director
Dr. CARLOS ARTURO GUERRERO
M.D. Msc. PhD
Profesor Titular
Facultad de Medicina**

Grupo de Investigación: Metabolismo óseo del laboratorio de biología molecular y celular
de medicina.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Odontología.
Posgrado de Ortodoncia
Bogotá D.C. Colombia
2015

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Doy gracias principalmente a mi papá quien ha sido fuente inagotable de apoyo durante toda mi vida, en mis proyectos y formación académico, a mis tías: Rosita Trujillo por su igualmente enorme apoyo y cariño de madre, a Margarita Bedoya y su familia por su constante interés y soporte, y a mi abuela Ana María quien siempre me ha dado confianza y su energía espiritual en mi formación.

A toda mi familia y amigos, que saben lo importante que son para mí, y que de alguna forma hacen parte del desarrollo de mi especialidad.

A los docentes Dr. Salomón Yezioro, el cual me abrió las puertas en el área para desarrollar este proyecto y la Dra. Natalia Carrillo por su incondicional interés y apoyo en el desarrollo del mismo.

Al Dr. Carlos Guerrero, director del proyecto, por su disposición y apoyo en la elaboración de este y al Dr. Pedro Moreno estudiante de maestría quien no solo me enseñó la mayor parte de lo que tenía que saber en el laboratorio, sino que también me ayudo durante todo el proceso de la fase experimental del proyecto.

Y finalmente dedico este trabajo de grado y todos mis logros a mi mamá Luz Elena Trujillo Fernández, sin ella no estuviera donde voy...

Al universo gracias.

Resumen

Con el objeto de evaluar la actividad resortiva de las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP), estas fueron aisladas mediante un gradiente de ficol-Hipaque y estimuladas con 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) durante 72 h en medio de cultivo RPMI 1640 y suero fetal bovino al 10%. Aproximadamente 20.000 células fueron fusionadas con PEG 3000, otro grupo aproximadamente del mismo tamaño fueron sometidas a fuerza centrífuga a 60 RPM durante 120 h, sembradas sobre láminas de hueso cortical bovino estériles de aproximadamente 5 x 5 mm² x 0.5 de alto y tratadas o no con N-acetilcisteína (NAC). Para esto, se dividieron en 6 grupos de la siguiente manera: 1. Células no fusionadas. 2. Células no fusionadas + NAC. 3. Células no fusionadas + fuerza centrífuga. 4. Células no fusionadas + fuerza centrífuga + NAC. 5. Células fusionadas con PEG. 6. Células fusionadas con PEG + NAC. Transcurrido el tiempo de cultivo las células se fijaron con metanol ácido acético en proporción 1:3; se procedió a identificar proteínas de membrana utilizadas como marcadores característicos de osteoclastos. Entre estas proteínas están: ADAM-12, ATPasa, Integrina β3, DC-stamp, Receptor de calcitonina y Catepsina K. Igualmente se evaluó la actividad de la enzima tartrato resistente (TRAP). Posteriormente las células se retiraron de la lámina ósea y se evaluó la actividad resortiva sobre el hueso donde se cultivaron las células. Se encontró que al fusionar células con PEG, o aplicar fuerza centrífuga a células no fusionadas, se inducen marcadores característicos de células osteoclasticas y actividad resortiva, probablemente relacionado con un aumento de ROS, dado que al aplicar NAC los marcadores y la actividad resortiva disminuyen.

Palabras clave: N-acetilcisteina, polietilenglicol, osteoclasto, marcadores osteoclasto, metabolismo óseo, resorción y células mononucleares.

Abstract

Whit objective In order to assess the resorptive activity of mononuclear cells from peripheral blood (PBMC), these were isolated by a gradient of ficoll-Hypaque and stimulated with 10 ug / ml phytohemagglutinin (PHA) for 72 h in RPMI 1640 fetal bovine serum and 10%. Approximately 20,000 cells were fused with PEG 3000, another group of about the same size were subjected to centrifugal force for 60 RPM durante 120 h, planted on sheets of cortical bovine bone sterile approximately 5 x 5 mm x 0.5 tall and treated or not with N -acetilcystein (NAC). For this, they were divided into 6 groups as follows: 1. Cells unfused. 2. unfused + NAC. 3. unfused + centrifugal force. 4. unfused + centrifugal force+ NAC. 5. cells fused with PEG. 6. cells fused with PEG + NAC. After the culture time the cells were fixed with acetic acid methanol in proportion 1: 3; we proceeded to identify membrane proteins used as markers characteristic of osteoclasts. Among these proteins are: ADAM-12, ATPase, β 3 integrin, DC-stamp, cathepsin K, calcitonin receptor and activity enzyme tartrate resistant (TRAP) was evaluated. The cells were removed from the plate, and resorptive activity was evaluated on bone where the cells were grown. It was found that by fusing cells with PEG, or applying centrifugal force to unfused cells, markers characteristic of osteoclastic cells are induced and resorptive activity, probably related to an increase in ROS, since applying NAC markers and resorptive activity decrease.

Keywords: N-acetylcysteine, polyethylene glycol, osteoclasts, osteoclast markers, bone metabolism, bone resorption and mononuclear cells.

Contenido

	Pág.
Resumen	VI
Lista de figuras.....	11
Lista de símbolos y abreviaturas	12
1. Introducción	13
2. Justificación	14
3. Marco teórico.....	16
3.1 Osteoclasto.....	16
3.2 Resorción ósea.....	20
3.3 RANK, RANKL Y OPG.....	22
3.4 Resorción ósea y dental en ortodoncia	24
3.5 Células de sangre periférica	28
3.6 Modelo para generar células con actividad osteoclastica.....	29
3.7 N-acetilcisteína	31
3.8 Polietilenglicol (PEG)	32
3.9 Marcadores propios de osteoclastos.....	33
3.9.1 ADAM 12.....	34
3.9.2 ATPasa	34
3.9.3 Integrina B3.....	35
3.9.4 DC-stamp.....	35
3.9.5 Receptor de calcitonina.....	36
3.9.6 Catepsina K	36
3.9.7 TRAP	37
4. Objetivos.....	38
4.1 Objetivo general.....	38
4.2 Objetivos específicos	38
5. Materiales y métodos	39
5.1 Láminas de hueso	39
5.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y cultivo	40
5.3 División de la muestra.....	41
5.4 Fusión celular con PEG y fuerza centrifuga	41
5.5 Marcadores de osteoclasto	43
5.5.1 Inmunofluorescencia	43

5.5.2	Determinación de la fosfatasa ácida resistente al tartrato TRAP.....	44
5.6	Evaluación de la actividad resortiva.....	45
6.	Resultados	47
6.1	Evaluación mediante de la expresión de marcadores osteoclasticos.....	47
6.1	Evaluación de la expresión de la enzima TRAP	51
6.2	Evaluación de la actividad resortiva.....	54
7	Discusión.....	58
8	Conclusión	62
9.	Recomendaciones	63
	Bibliografía	64
	Anexo 1	71
	Consentimiento informado.....	71
	Anexo 2.....	78
	Microfotografías.....	78

Lista de figuras

	Pag.
Figura 1:	
Ultraestructura del osteoclasto y sus tres principales zonas.....	18
Figura 2:	
Principales vías bioquímicas y de transporte en el osteoclasto.....	22
Figura 3:	
Interacción del RNAK, RANKL y OPG en el metabolismo óseo.....	24
Tabla 1:	
Número de grupos de células para inmunofluorescencia de anticuerpos.....	49
Figura 4:	
Inmunofluorescencia ADAM12, ATPasa, INTEGRINA β 3.....	50
Figura 5:	
Tinción TRAP+, fusionadas con PEG, PEG+NAC, fuerza centrífuga, fuerza centrífuga+NAC, no fusionadas, no tratadas con fuerza (CONTROL) y CONTROL+NAC	52
Figura 6:	
Número de grupos de células para la tinción de TRAP+.....	53
Figura 7:	
Microfotografías de tinción Coomassie para evaluar lagunas de resorción, fusionadas con PEG, PEG+NAC, fuerza centrífuga, fuerza centrífuga+NAC, no fusionadas, no tratadas con fuerza (CONTROL) y CONTROL+NAC	55
Figura 8:	
Número de lagunas de resorción en los 6 grupos experimnetales.....	56

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Definición
μ	Micra
μ l	Microlitro
β	Beta

Abreviaturas

Abreviatura	Término
BMM	Bone marrow macrophages=Precusores de osteoclastos
CFU	Unidad formadora de colonias
CMNSP	Células mononucleares de sangre periférica
MAP	Proteína activadora de mitogenesis
MEC	Moléculas de adhesión extracelular
mM	Pero molecular
NAC	N-acetilcisteina
NFkB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
No f	No tratadas con fuerza
No fu	No fusionadas
PEG	Polietilenglicol
PHA	fitohematoaglutinina
RANK	Receptor activador para el factor nuclear κ B
RANKL	ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bobino
SOD	Superoxido dismutasa
SOFAT	Factor de activación osteoclastogenico secretado por células t

1.Introducción

Los osteoclastos son células diferenciadas terminales, provenientes de la línea hematopoyética que realizan actividad resorptiva sobre hueso o tejidos mineralizados y presentan marcadores característicos. Se han ensayado diferentes modelos para tener células con actividad resorptiva, algunos utilizan hormonas recombinantes de alto costo, cultivan las células durante aproximadamente 15 días o más para lograr la diferenciación y que presenten marcadores positivos para osteoclastos con actividad resorptiva (1) (2) (3).

Las células obtenidas en el laboratorio con actividad resorptiva y marcadores típicos de células osteoclasticas se le denominan “osteoclast-like cell” o células similares a osteoclastos.

En el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional se ha generado un modelo con actividad resorptiva consistente en fusionar células de origen monocito-macrófago (U937 humanas o J774 de ratón), células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) humanas, fibroblastos de origen gingival. La fusión se realiza con polietilenglicol (PEG). El mismo laboratorio encontró que al someter estas mismas células sin fusionar a fuerza centrífuga, desarrollaban actividad resorptiva y expresaban marcadores propios de osteoclastos. Esto trajo la posibilidad de evaluar su actividad resorptiva sobre hueso, en un modelo que es de fácil reproducción (4) (5).

2. Justificación

Se ha reportado que durante la actividad del osteoclasto o de células similares a osteoclastos, se aumentan las ROS (“reactive oxygen species”) probablemente por un aumento en la generación de hidrogeniones necesarios para generar un ambiente ácido y poder retirar el calcio del hueso o dentina en el proceso de resorción. En un estudio (6), cultivaron células de sangre periférica durante 3 semanas estimuladas con FSC-macrófagos y RANKL identifican la expresión diferencial de TBP-2 (proteína de unión tiorredoxina 2) y Trx-1 (tiorredoxina) la primera es una proteína antioxidante, que actúa como antagonista de las ROX, es importante en la regulación de factores de transcripción y en la inactivación del osteoclasto, la segunda es una agonista importante durante la osteoclastogénesis incluyendo mecanismos de activación del osteoclastos; cuando al cultivo le agregaron RANKL, la expresión de TBP-2 se redujo, mientras que se incrementó Trx-1 sugiriendo que Trx-1 está presente en la diferenciación y activación de los células similares a osteoclastos y cuando aplicaron el antioxidante N-acetilcisteína revirtió este patrón aumentando TBP-2 y reduciendo Trx1, con lo cual se inhibió marcadamente la osteoclastogénesis. La aplicación de N-acetilcisteína (NAC) como agente reductor inhibió la actividad osteoclastica bloqueando la acción de NOX (NADPH oxidase) y SOD (superóxido dismutasa), proteínas que conducen a la formación ROS. Cuando se aplica al cultivo celular NAC se inhibe la respuesta de las células BMM al RANKL, incluyendo la producción de ROS, inhibe la diferenciación de osteoclastos o disminuye su función resortiva

Por esta razón se quiere explorar si células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) humana fusionadas con PEG o sometidas a fuerza centrífuga, presentan modificación de la actividad osteoclastica al tratarlas con NAC (7).

3. Marco teórico

3.1 Osteoclasto

Los osteoclastos como los conocemos actualmente fueron descritos en 1873 por Kolliker, quien propone inicialmente el término de ostoklast para células multinucleadas, móviles, que presentan en su superficie activa una estructura que se describe en la literatura como borde en cepillo y que aún es vigente para la superficie en contacto con el tejido óseo, dentina o cemento, allí genera la conocida laguna de resorción, cumpliendo así su función al extraer el componente inorgánico, pasándolo a la circulación sanguínea y descomponiendo la matriz orgánica del hueso la cual reutiliza y/o exporta a la matriz extracelular, es una célula de gran tamaño 85 a 100 micras aproximadamente, puede incluir hasta 150 núcleos, cobra una significativa importancia en el metabolismo óseo, su función es la resorción ósea, desempeñan importantes funciones en el área de odontología y en procesos patológicos como periodontitis, procesos como crecimiento y desarrollo, movimiento dental, oseointegración, injertos y reparación de fracturas, en el remodelado óseo de estructuras de interés como maxilares y viscerocráneo, entre otros (5) (8) (9).

En cuanto a la estructura general del osteoclasto se reconocen 3 regiones específicas:

1. **Zona clara o zona de sellado** es un perímetro de citoplasma, contiguo al borde en cepillo, contiene abundantes microfilamentos de actina, estos se

hallan organizados en una estructura circular que está rodeada en ambos lados por proteínas de unión a la actina (integrina, vinculina y talina), en esta zona existen moléculas de adhesión célula – MEC que forman el sello apretado entre la membrana celular y la matriz ósea mineralizada. Varias clases de receptores están presentes para mantener el sellado: integrinas como $\alpha v \beta 3$ para vitronectina, receptor $\alpha 2 \beta 1$ para colágeno o $\alpha v \beta 2$, al interior de esta zona se forma el borde festoneado o borde en cepillo (10).

- 2. Borde festoneado o en cepillo:** Es la porción del osteoclasto en contacto directo con el hueso; contiene muchos repliegues profundos de la membrana plasmática que forman estructuras de tipo microvellosidades, es una zona altamente permeable encargada de aumentar el área de extensión de esta superficie, para la exostosis de las enzimas hidrolíticas, proteolíticas y secreción de protones por las bombas protónicas dependientes de ATP, de igual manera estos repliegues también favorecen la endocitosis de los productos orgánicos e inorgánicos resultado de la degradación ósea, en el citoplasma cerca del borde festoneado hay una gran cantidad de mitocondrias y lisosomas, los núcleos se ubican generalmente en la parte más alejada de la superficie ósea (10).
- 3. Zona basolateral:** interviene en la exocitosis del material digerido, las vesículas de transporte con material óseo degradado, se fusionan con la membrana celular para liberar su contenido al medio extracelular (10).

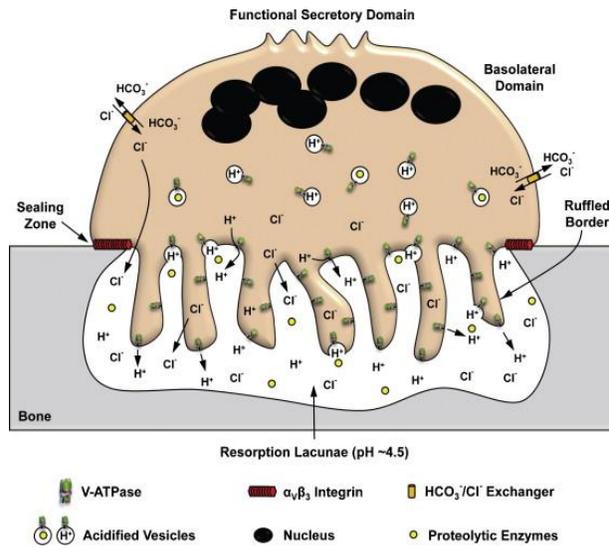


Figura 1. Ultraestructura del osteoclasto y sus tres principales zonas (10).

El origen del osteoclasto no es totalmente claro, se han planteado varias teorías, algunas de ellas son: la primera entre 1949 al 1970 que el osteoclasto y el osteoblasto tenían el mismo linaje, los osteoblastos se fusionaban para formar el osteoclasto, y viceversa cuando en ciertas ocasiones el osteoclasto se dividía para formar osteoblastos y estos formaban el osteocito; posterior a esto 1970 se propone la teoría bifiletica, en donde se plantea que los osteoblastos y osteoclastos tenían diferente linaje y finalmente para inicio de los 80 se reconoció al sistema fagocito-monocítico como precursor del osteoclasto, aceptándose su origen como hematopoyético, derivando entonces de “Unidades formadoras de colonias de granulocito-macrófagos” (CFU – colony-forming unity), así mismo precursoras de monocitos y macrófagos derivados inicialmente de la estirpe celular hematopoyética comprometida con la línea mieloide, son estimulados por ligandos como el RANKL marcador de actividad y proliferación de osteoclastos, también se plantea la inhibición de estos tanto en actividad como en cantidad por

las OsteoProteGerinas (OPG) producidas por fibroblastos, osteoblastos, osteocitos y células de tejido conectivo próximos al hueso (5) (11) (12).

Sin embargo gracias a los recientes avances y conocimiento de plasticidad celular, reconociéndose otros orígenes como es recientemente aceptado, y aún más popularizado por el premio Nobel de fisiología y medicina en 2012 Sir Johon B, y otros autores como Gurdon, Shinya Yanamaka, los cuales demostraron que las células maduras pueden reprogramarse a células pluripotenciales, generándose el concepto de desdiferenciación, y a partir de esta condición la célula toma una línea para diferenciarse nuevamente en la célula para la cual se está generando algún estímulo o mediador, y todo esto dependiendo de la necesidad del sistema, quedando entonces la posibilidad de grandes adelantos, al no limitar los linajes celulares a determinados órganos, así, la plasticidad celular reciente y significativo hallazgo científico evidencia el potencial genético que mantienen todas las células nucleadas del cuerpo, aun incluso aquellas totalmente diferenciadas o maduras, gracias a la información presente en el material genético, del cual toda célula cuenta con un juego en su núcleo, abriendo grandes posibilidades al campo científico y eliminando limitaciones conceptuales de gran importancia con las cuales se habían desarrollado los conceptos de diferenciación hasta ese momento, ahora debemos abrir la mente a una gran cantidad de posibilidades antes inconcebibles desde la biología y genética para cualquier célula nucleada (4) (13) (14) (15).

3.2 Resorción ósea

El termino **resorción ósea** puntualmente hace referencia a la disolución y desintegración del tejido óseo, retirando parte de este de un tejido que conformaba una estructura, al tiempo que se hace la **reabsorción** del mismo para pasar a circular en sangre en forma de calcio, otros minerales y algunos productos de la degradación de la materia orgánica en el hueso, solo en este momento se realiza la reabsorción; se usa frecuentemente de forma indiscriminada los dos términos resorción y reabsorción, y a nivel óseo se están dando primero resorción y luego reabsorción ya que este segundo término (reabsorción) en el cual se hace referencia al verbo reabsorber quien por su parte refiere absorber nuevamente, puede ser mejor usado en la fisiología renal, en donde la arteria renal lleva sangre que contiene glucosa previamente resorbida y los riñones la reabsorben (resorben nuevamente) (16) (17).

El doctor Del Nero Vera, médico y odontólogo propone también el término de resorción ósea o dental como una inflamación sobre el tejido mineralizado en el cual hay una desintegración de la matriz orgánica e inorgánica y posterior paso del resultado a la circulación en sangre (18).

También hay otra diferencia con una connotación un poco semántica, en la cual se utiliza el término resorción para la adsorción de estructuras propias del cuerpo, por ejemplo hueso, tejidos o líquidos propios y reabsorción para agentes externos por ejemplo una sutura reabsorbible (19).

Durante el proceso de resorción ósea la estructura inorgánica debe ser degradada del hueso, la cual, está constituida por una fase mineral de hidroxiapatita, seguida por la degradación de la parte orgánica del hueso formada en su mayoría por colágeno tipo 1 (>90%) y proteínas no colágenas. En la desmineralización del hueso se produce una acidificación del microambiente extracelular, este proceso es mediado por la enzima vacuolar H⁺-ATPasa (similar

a una bomba de protones) localizada en el borde de cepillo que se identifican como entradas y salidas citoplasmáticas especializadas, el cual aumenta su superficie de contacto y se adhiere con este al área ósea que va a ser resorbida. Debido a un abundante transporte de protones por un intercambiador independiente de energía (Cl-/HCO₃) sobre la superficie opuesta al borde de cepillo del osteoclasto mediado por la anhidrasa carbonica II (CAII) a partir de CO₂ y H₂O.

El resultado de este transporte de iones es la secreción de HCl (ácido clorhídrico) en el microambiente de resorción llevando a un pH aproximado de 4.5, sumándose a ello la expresión de enzimas líticas como el TRAP y pro-CATEPSINA K, en un pozo de resorción denominado lagunas de Howship o **lagunas de resorción**. Así mismo ácidos como el cítrico y el láctico, liberados por las vesículas secretoras y por las mitocondrias son expulsados en la laguna de resorción a través del borde de cepillo, en donde disuelve las sales óseas y produce lisis del hueso en forma de cavidades formando túneles que pueden llegar a tener entre 100 y 500 μM de largo. Los productos del desarrollo de las lagunas, entran a la circulación: calcio, fósforo y aminoácidos constituyentes de las proteínas óseas principalmente del colágeno, especialmente prolina e hidroxiprolina, que a la vez van a estimular la calcitonina y la PTH de acuerdo con la concentración del calcio iónico y sérico; estos productos metabólicos son utilizados como marcadores biológicos que indican resorción ósea (20) (21) (22).

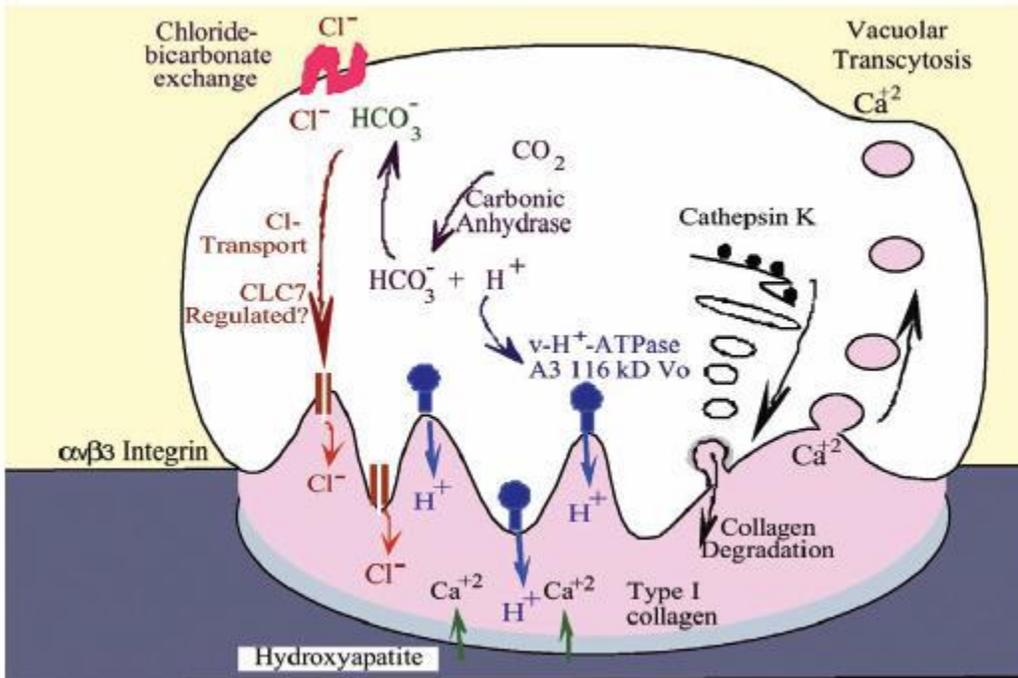


Figura 2. Principales vías bioquímicas y de transporte en el osteoclasto (23).

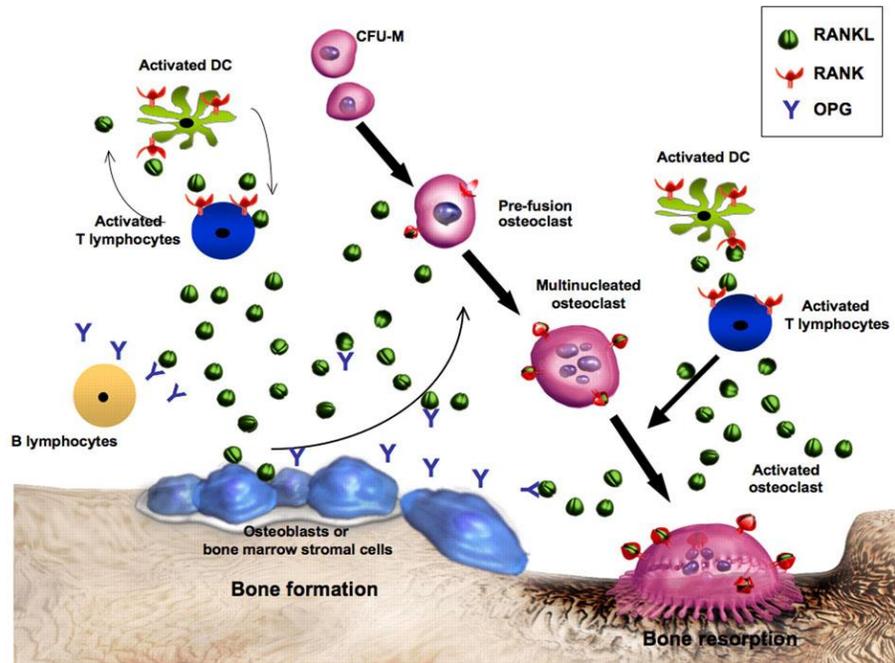
3.3 RANK, RANKL Y OPG

Para que el osteoclasto inicie su función resortiva, debe ser activada por el RANKL (ligando para el receptor activador del factor nuclear $\kappa \beta$), molécula principal involucrada en la activación del osteoclasto producida por los osteoblastos, las células del estroma, los linfocitos T, fibroblastos entre otras. Los efectos del RANKL están mediados por su unión a un receptor altamente específico, el RANK (El receptor activador del factor nuclear $\kappa \beta$), una proteína transmembrana expresada por los osteoclastos, preosteoclastos, monocitos. La unión del RANK con su ligando RANKL, induce la activación de una cascada de eventos intracelulares que llevan a la diferenciación y activación de los osteoclastos (11) (24) (25) (26).

Las células T son una fuente importante de RANKL, experimentos *in vitro* e *in vivo* demuestran que la activación de células T conlleva al incremento en osteoclastogénesis y resorción ósea. Sugiriendo que los estados inflamatorios agudos y crónicos, al igual que ciertas leucemias, contribuyen con pérdida patológica de masa ósea mediada por osteoclastos (5) (27).

El RANKL tiene un inhibidor competitivo que inhibe su unión al ligando RANK, denominada osteoprotegerina (**OPG**) miembro de la superfamilia de receptores del TNF segregado por los osteoblastos no anclados a la membrana. Actúa como señuelo uniéndose al RANKL y neutralizándolo (receptor trampa), impide su unión con el RANK, inhibe la diferenciación, supervivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce su apoptosis. Sin embargo recientemente una nueva citoquina producida por las células T, denominada **SOFAT** (por sus siglas en inglés Secreted osteoclastogenic factor of activate T Cell), evaluado en monocitos de ratón de la línea RAW 264.7 demostraron que al ser estimulados con SOFAT, expresan marcadores osteoclastogénicos como integrina $\alpha\beta3$, captosina K y anillos de actina aun cuando dichas células se estimulan simultáneamente con OPG, demostrando que esta citoquina estimula la formación de células similares a osteoclastos y no está mediada por RANKL (27).

Dai y colaboradores plantean que la interleukina 18 (IL-18) directa o indirectamente tiene efectos osteoclastogénicos mediado por células T en Artritis Reumatoide (AR) sinovial. Compararon sus efectos con la incorporación de IL1 β y TNF α . Esta investigación concluye que en presencia de PHA la cual pre estimulaba las células T o células T sinoviales de AR, IL18, IL1 β , o TNF α incrementaba el RANKL soluble, la expresión de RANKL membranal en una relación dosis dependiente. Pero no induce la expresión de M-CSF, GM-CSF, IFN γ u OPG. Indicando además, que puede estimular la producción de osteoclastos a través de la sobre regulación de RANKL en las células T AR sinoviales (28).



Figuro 3. Interacción del RNAK, RANKL y OPG en el metabolismo óseo. (29)

3.4 Resorción ósea y dental en ortodoncia

Durante el movimiento dental en los tratamientos ortodónticos es necesaria la presencia de todos los tipos celulares del metabolismo óseo; así, la resorción por parte de los osteoclastos en las zonas de presión sobre el ligamento periodontal y depósito por parte de los osteoblastos en zonas de tensión, son indispensables para que se produzca el movimiento dental a través del remodelado óseo, pero, al llegar a la finalización del tratamiento ortodóntico, se pretende mantener esta posición dental final lograda y evitar a toda costa la recidiva del movimiento; para ello es indispensable que se suspenda este remodelado óseo, y así evitar el movimiento dental, ya que la mayoría de los tratamientos ortodónticos tienen

algún grado de recidiva, sería ideal contar con un reactivo biológico para evitar la recidiva del movimiento dental ortodóntico. Una posible forma, es evitando la resorción ya que se suspendería hueso alveolar impidiendo el movimiento por un nuevo remodelado óseo de su soporte y conservando el diente en la posición lograda por el tratamiento ortodóntico, sin embargo hasta ahora continua siendo vigente el uso de un retenedor mecánico (placas Hawley, acetatos, placas Essyx, retenedores fijos en lingual y en vestibular, entre otros) que no siempre tienen buena aceptación por parte del paciente y que se muestran en la mayoría de los casos poco aceptados por parte del paciente como único mecanismo para mantener los resultados del tratamiento activo de la ortodoncia correctiva (30) (31) (32) (33).

El movimiento dental inician con una fuerza mecánica normalmente generada sobre la corona del diente, en la cual hay un aumento en la presión de los fluidos en el sistema LCS (lacuno-canalicular) y esto se traduce como un estímulo químico a los receptores de superficie celular de los osteocitos (integrinas) allí se genera una afluencia celular de Na y Ca al interior del osteocito, activando las vías de las MAP que a su vez activan los factores de transcripción CREB y NFAT (34).

El espacio en la matriz que rodea las inmediaciones de la célula y los procesos citoplasmáticos, forman la laguna y los canalículos osteocitarios, generando una red tridimensional interconectada a través de la cual transitan líquido intersticial y sustancias como citoquinas, aportando así la porosidad característica. A esta red se le conoce como el *sistema lacuno-canalicular (LCS)* y cobra especial importancia en el tránsito metabólico e intercambio de sustancias así como también en la nutrición de las células. Una de las principales funciones que se le atribuye al osteocito y al LCS es la capacidad de pensar y transducir los estímulos mecánicos que actúan sobre el hueso, a estímulos citoquímicos (34)..

El movimiento ortodóntico entonces se puede interpretar así: con una fuerza dirigida hacia la derecha, va a existir un lado de presión (derecha) donde hay actividad osteoclástica; y un lado de tensión (izquierda) donde hay elongación de las fibras del ligamento que estimula el movimiento de los fluidos en los canales del hueso y esto se traduce en una señal química para los osteocitos que responden a estímulos que causan **tensión** en el hueso y se liberan monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), osteocalcina y factor de crecimiento similar a insulina. La liberación de estos factores facilita la incorporación de preosteoblastos que favorecen el remodelado óseo por depósito de matriz y su posterior mineralización.

Todo lo contrario en los sitios de **presión** en donde tenemos que la transducción de esta compresión mecánica a estímulos citoquímicos generara la síntesis de factores preosteoclasticos, incluyendo, FNT, Interleuquinas, RANL entre otros, como ya fue descrito en el ítem 3.2 y 3.3 de resorción ósea.

La reabsorción radicular es un aspecto de mucho interés en el área de ortodoncia ya que muchos pacientes presentan esta condición durante la evolución del tratamiento, las condiciones a través de las cuales se puede presentar se han planteado en relación a magnitudes para la fuerza que podría estar generándose para el movimiento dental, un límite de 250 gr parecería fácil de identificar antes de estar realizando fuerzas con posibilidad de resultar en una reabsorción radicular, sin embargo hay muchas otras variables e individualidad de cada paciente que intervienen en este proceso.

El mecanismo biológico de la reabsorción radicular consiste en una hialinización inicial o necrosis vascular aséptica por el exceso de presión sobre el ligamento periodontal, que altera el ambiente bioquímico, comienza con la reabsorción del cemento al reclutar células para la eliminación de las áreas hialinizadas, principalmente macrófagos que se acumulan para eliminar el tejido necrótico. La laguna formada puede continuar si el estímulo desencadenante continúa o empieza a repararse de 2 a 4 semanas si se elimina dicho estímulo. Los

odontoclastos son los encargados de la reabsorción radicular desmineralizando el tejido calcificado y degradan la matriz orgánica, tienen la misma función del osteoclasto el término obedece simplemente a su localización al igual que también se plantea el uso de cementoclastos para aquellos encargados de resorber el cemento; esta reabsorción radicular es una respuesta que se caracteriza por la producción de: Prostaglandina E2: regulada por las hormonas paratiroides y calcitonina, neurotransmisores como la sustancia P y el polipéptido intestinal vasoactivo, citoquinas e Interleuquinas (IL1 alfa y beta, IL2), factor de necrosis tumoral e interferón gama (35) (36) (37).

Se han descrito varias clasificaciones para la resorción dental entre ellas podemos destacar:

Resorción radicular externa: Es un proceso patológico que se inicia por un estímulo externo, que avanza desde el cemento hacia la dentina y que afecta la superficie externa o lateral de uno o varios dientes. En cuanto a su prevalencia, algunos autores reportan que oscila entre 0.5 – 3 mm de reducción radicular durante el tratamiento de ortodoncia (38).

Resorción de superficie: Es un proceso autolimitante que compromete áreas pequeñas de la superficie radicular.

Resorción Inflamatoria: Se relaciona con células multinucleadas que colonizan las superficies desprovistas de cemento y reabsorben la dentina. A su vez se subdivide en: *transitoria* (cuando el daño es de poca magnitud y duración, no se detecta radiográficamente y es reparado por cemento rápidamente) y *progresiva* (por estímulos de largos períodos) mayor magnitud con el tiempo (38).

Resorción radicular por reemplazo: Se produce por una necrosis extensa del ligamento periodontal con formación de hueso sobre en la raíz. El hueso reemplaza lentamente el cemento perdido produciendo anquilosis. Para diagnosticar la anquilosis, un posible método es realizar percusión suave en el

diente y tener presente el sonido que emite (metálico), o ante el intento de movimiento por 3 meses y no ver respuesta (38).

Se considera como barreras para evitar esta resorción el cemento, más aun el cemento celular y todos los tejidos blandos ya que estos tienen el potencial de producir OPG lo que constituye un mecanismo para inhibir la acción de los osteoclastos (37).

3.5 Células de sangre periférica

Las células mononuclear de sangre periférica (PBMC) son células sanguíneas caracterizadas por poseer un solo núcleo redondo, entre ellas se diferencian: los linfocitos y monocitos, hacen parte del sistema inmune con múltiples funciones como son: defensa inmunológica, metabólica e inflamatoria. Forman poblaciones heterogéneas que se distribuyen en diferentes tejidos y órganos, adicionalmente están disponibles para llegar a donde hay irrigación sanguínea y fuera de ella ya que responden a citoquinas quimio atrayentes (12).

Se originan en la medula ósea a partir de células madre pluripotenciales por efecto de las citoquinas GM-CSF, M-CSF e IL 1 y 3. Tienen una vida promedio de 60 días tiempo tras el cual, si no se encuentran activas mueren por apoptosis. Aunque también pueden convertirse en células fagocíticas fijas o células de patrullaje que llegan a sitios puntuales tras el estímulo adecuado (12).

Entre las células mononucleares de sangre periférica encontramos los linfocitos T y B, los cuales tienen relación con el metabolismo óseo. Linfocitos T, expresa PPR funcional, responde a la PTH y estimula la diferenciación OB (osteoblastos) también producen RANKL para la estimulación de osteoclastos. El papel del mecanismo de acción de la PTH en las células T, permaneció sin detectar durante un periodo de tiempo, pero ya se conoce que al trasplantar tumores para

la producción de PTH y / o PTHrP en ratones causa una hipercalcemia por aumento de la resorción y simultáneamente de linfocito T, algunos autores las consideran pre-osteoclastogénicas (39).

Las células mononucleares obtenidas de sangre periférica cultivadas se obtienen usando Ficol hypaque, un polisacárido hidrofílico que separa capas de la sangre, con monocitos y linfocitos formando un *buffy coat* bajo la capa del plasma. Este *buffy* contiene las PBMCs (40) (41) (42) (43).

Para aumentar su cantidad estimulando la actividad mitogénica en cultivo se plantea el uso de fitohematoaglutinina (FHA), puntualmente en el caso de los linfocitos T (28).

3.6 Modelo para generar células con actividad osteoclastica

Se ha definido la actividad y conceptos en relación con los osteoclastos, así como la plasticidad celular para la desdiferenciación con la connotación de que toda célula tiene el potencial de ante un estímulo generar otra diferente o expresar fenotípicamente funciones para las que inicialmente no estaba programada, todo esto en realidad obedece es aun adecuado estímulo, entonces, podríamos identificar mecanismos para inhibir funciones, de forma local o para limitarlas, tendiendo control sobre la actividad de la célula y con ello plantear controles para patologías, disminuyendo su evolución o eliminándolas (13).

Ya se ha indicado como en el laboratorio de biología molecular de la facultad de medicina de la Universidad Nacional se ha generado un modelo con actividad resorptiva consistente en fusionar células de origen monocito-macrófago de las líneas U937/A and J774 de ratón o células mononucleares de sangre periférica

(CMNSP) humanas, e incluso fibroblastos de origen mucosa palatina, químicamente con polietilenglicol (PEG). El mismo laboratorio determino que al someter células de estas líneas a fuerza centrífuga desarrollaban actividad osteoclastica tanto resortiva como la expresión de marcadores propios de osteoclastos. Esto trae la posibilidad de evaluar su actividad resortiva sobre el hueso, en un modelo que es de fácil reproducción y de menor costo comparado con el estímulo hormonal o de paquete comerciales (4) (5) (6) (44) (45).

Adicionalmente ha sido publicado desde 2008 por Wei y colaboradores el efecto de las fuerzas centrifugas en cultivos de fibroblastos de ligamento periodontal con potencial de desarrollar expresión de actividad osteoclastica (46).

Desde 1987 un estudio de Lorenzo y colaboradores donde utilizaban la PHA (fitohematoglutinina) como estimulador de CMSP sumado con IL-1 recombinante, y TNF α , encontraron que el efecto de PHA favorecía la síntesis local de IL-1 y ésta media la actividad resortiva, concluyendo que las citoquinas se encuentran en la circulación de individuos normales y se producen en los sitios localizados de diversas patologías, ante estímulos como lesiones, o en cualquier proceso inflamatorio, esto sugiere que puede influenciar el metabolismo esquelético normal o anormal (45) (47).

Kotaque a partir de células obtenidas de reemplazos articulares en pacientes con artritis reumatoidea concluye que la PHA activa las células T humanas expresando RANKL la cual induce osteoclastogénesis de monocitos periféricos autólogos, los cuales pueden ser bloqueados por inhibición dosis dependiente de OPG y que en general se observa un aumento en la expresión de RANKL en las células de pacientes con Artritis reumatoidea (48).

Weitzmann y colaboradores encontraron que la PHA activa células T CD4+ y CD8+ humanas y estimula la formación de osteoclastos in vitro por RANKL (44) (49).

3.7 N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC, N-acetil-L-cisteína) es del grupo (-CO-CH₃) unido al grupo amino (NH₂) aminoácido L-cisteína además de un acetilo y un nitrógeno lo cual le confiere disminuir ligeramente la característica hidrofílica de la L-cisteína, los aminoácidos que contiene, tienen propiedades antioxidantes, el grupo acetil cisteína la hace más soluble igualmente en agua, facilitando funciones para la absorción y velocidad de distribución al ser ingerida por vía oral. Se considera la NAC segura, incluso en grandes dosis, y es una buena fuente de cisteína (aminoácido) (50).

El átomo de hidrógeno en el sulfidrilo (-SH), molécula anti-oxidante que contienen azufre (tioles) puede actuar como un electrón para neutralizar los radicales libres (50).

El ligando RANKL (factor nuclear kappa β) es esencial para la diferenciación y activación del linaje monocito-macrófago (BMM) a osteoclastos. Se ha demostrado que el RANKL estimula las células transitoriamente BMM aumentando el nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de una cascada de señalización que implica TNF (factor de necrosis tumoral) receptor del factor asociado (TRAF), Rac1, y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) NADPH oxidasa (Nox). La aplicación de N-acetilcisteína (NAC) bloquea la actividad de Nox (NADPH oxidasa) y SOD (superóxido dismutasa), proteína que conduce a la formación ROS, inhibiendo la respuesta de las células a BMM al RANKL, incluyendo disminución en la producción de ROS, la activación de la

quinasa c-Jun N-terminal (JNK), p38 proteína (MAP) quinasa activada por nitrógeno, la señal extracelular-quinasa regulada (ERK), y la diferenciación de los osteoclastos (7) (9) (51).

En un estudio llevado a cabo por Aitken y colaboradores identifican que la expresión diferencial de TBP-2 (proteína de unión tiorredoxina 2) y Trx-1 (tiorredoxina) se produce durante la osteoclastogénesis, que en presencia de RANKL, la expresión de TBP-2 se redujo, mientras que se incrementó Trx-1. El antioxidante N-acetilcisteína revirtió este patrón, aumentando TBP-2 y reduciendo Trx1, con lo cual se inhibió marcadamente la osteoclastogénesis, **concluye que moduladores del sistema Trx tales como antioxidantes (NAC) tienen potencial como terapias antirresortiva (6).**

Lo descrito anteriormente es la base teórica que permite sustentar el uso de NAC en nuestro proyecto y su posible aplicación en la clínica para inhibir la resorción ósea o buscar otros reductores y antioxidantes con similares efectos.

3.8 Polietilenglicol (PEG)

El PEG es un polímero de óxido de etileno con un hidroxilo terminal ($C_2H_6O_2$. 1,2-dihidroxietano).

Este polímero comenzó a ser usado en la década de los 70 en la producción de hibridomas (línea celular fija obtenida a través de la fusión de células) (45) (44).

El PEG, es soluble en agua a temperaturas moderadas a diferentes concentraciones y sobre un amplio rango de pesos moleculares. En la fusión celular, generalmente se utilizan pesos moleculares entre 100 y 10000 (52) (53).

Existen dos pasos importante para que el PEG induzca la fusión de membranas celulares: el primero es la agregación de las células antes de la fusión y segundo, la desestabilización de las membranas de las células agregadas, permitiendo esto que se dé la fusión, este proceso fue descrito por Arnold y colaboradores en el cual, la fusión entre vesículas agregadas o entre células ocurre cuando se utilizan altas concentraciones de PEG de bajos pesos moleculares (52).

Un requisito para inducir la fusión celular con PEG es que debe existir una gran cercanía de las membranas a fusionar; El PEG contribuye a cerrar los espacios o “gaps” de la interbicapa lipídica, entonces, remueve las moléculas de agua entre las bicapas adyacentes, debido a la alta afinidad que tiene este polímero por el agua (54).

Además, el solo PEG no puede iniciar la fusión, si los fosfolípidos de membrana se encuentran dañados o flácidos. Por lo que la fusión ocurre solo cuando la energía de superficie de las bicapas lipídicas es modificada por la adición de componentes de bajo estrés (53).

3.9 Marcadores propios de osteoclastos

Actualmente la forma más confiable de identificar y diferenciar una célula de otra es con marcadores, como receptores de membrana o expresados por la célula en cuestión, como proteínas o enzimas propias de sus funciones, así entonces se contara con parámetros de diferenciación constantes y confiables para hablar con propiedad de un grupo celular sea cultivado o identificándolo de un tejido in vivo (46) (55) (56).

Durante el proceso de resorción ósea la disolución de cristales y en general de la matriz inorgánica como fue descrito anteriormente se completa en el interior de vacuolas intracelulares donde fermentos proteolíticos, como la cisteinproteínasa ácida, la **catepsina K**, las colagenasas y metaloproteinasas neutras, destruyen la fracción orgánica. Los osteoclastos multinucleados y algunos mononucleados (monocitos) con potencial resortivo son positivos a **la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP)**, que se usa como su marcador más característico. Otro marcador de los osteoclastos es el **receptor de Calcitonina (RCT)**, es un regulador importante de homeostasis de Ca^{+2} con su acción directa en los osteoblastos que inhiben la actividad de resorción ósea. (57) (23).

3.9.1 ADAM 12

Es una metaloproteasa y desintegrina, hay más de 30 ADAM identificadas, 4 incluyendo la 12 son proteolíticas importantes, requiere de la presencia de metales como zinc o cobalto para su activación, a nivel óseo se considera también una proteína de anclaje a membrana del osteoclasto para iniciar su actividad resortiva, catalizando la fusión de células mononucleares para formar macrófagos y también la adhesión de estos al hueso (58) (59).

3.9.2 ATPasa

La capacidad de la excavación o resorción del hueso por los osteoclastos se debe al microambiente ácido con un pH de aproximadamente 4.5 entre la zona del borde en cepillo y la zona de sellado, para formar la laguna de resorción ósea, este microambiente es generado por la ATPasa H^{+} vacuolar, la cual acidifica con hidrogeniones la laguna y mantiene el equilibrio de hidrogeniones entre la laguna y el interior del osteoclastos, es indispensable para la actividad del osteoclasto (60) (61).

3.9.3 Integrina B3

La integrina B3 es una glicoproteína transmembrana que hace parte de los receptores de adhesión, que son los responsables de la interacción del osteoclasto con la matriz extracelular y en el reconocimiento entre las células, regula la motilidad celular y la organización del citoesqueleto para permitir su adhesión o paso a través del endotelio en la diapedesis. Esta localizado en la zona de sellado de los osteoclastos, se une a Arg-Gly-Asp (RGD) que contienen proteínas de la matriz extracelular como vitronectina, osteopontina, sialoproteína ósea. Así un integrina puede unirse a varios receptores y estos a su vez unirse a varias integrinas, las integrinas son indispensables para formar la zona de sellado sin la cual no podría ocurrir la resorción ósea (62) (63).

3.9.4 DC-stamp

La DC-stamp o Proteína Dendrítica transmembrana específica, es una proteína transmembrana originalmente identificada en células dendríticas o macrófagos, es estimulada por la IL4. Recientemente, se ha informado que puede inducir la diferenciación de osteoclastos y es inducida por el RANKL, sin embargo, el papel más conocido de DC-STAMP es en la fusión célula-célula y en vivo sigue siendo desconocido. En ratones nocaout con deficiencia de DC-STAMP, se demostró el compromiso de la multinucleación de macrófagos y osteoclastos, con lo que se puede demostrar la necesidad de su presencia en la fusión celular y con ello contribuye a posterior producción TRAP (64), (65) .

3.9.5 Receptor de calcitonina

La calcitonina es una hormona hipocalcémica que es secretada por las células C de la tiroides, sus dos principales objetivos son los riñones y el hueso. La calcitonina potencialmente inhibe la resorción ósea bloqueando la formación y la activación de los osteoclastos. El receptor sensible al calcio (RCa) regula la secreción de PTH y la reabsorción de calcio por los túbulos renales en respuesta a alteraciones en las concentraciones plasmáticas de calcio. En el RCa normal, la hipocalcemia induce un aumento de la secreción de PTH y la hipercalcemia reduce la secreción de PTH.

El receptor de calcitonina es utilizado frecuentemente para identificar células similares a osteoclastos, este marcador en células de la línea mielomonocítico solo es expresado por los osteoclastos para generar un mecanismo autoregulatorio de la hipercalcemia (5) (66) (67).

3.9.6 Catepsina K

La cisteína catepsina se encuentra principalmente en los compartimentos ácidos de las células. Su función es de proteasa en la degradación intracelular. De acuerdo al descubrimiento de nuevas catepsinas como la K, V y F, ha proporcionado evidencia de que también participan en eventos biológicos específicos. La catepsina no es estrictamente lisosómica, las proteasas son transportadas entre fagosomas, endosomas, lisosomas y enzimas. La acidificación del espacio pericelular de los osteoclastos aumenta la liberación de

la catepsina K para promover la proteólisis extracelular. Esta enzima es crucial en la remodelación ósea, en particular en la ruptura de colágeno (68) (69).

3.9.7 TRAP

El TRAP (Fosfatasa ácida tartrato-resistente) Se considera una enzima casi inexistente en los tejidos humanos, excepto sobre el hueso que expresa gran cantidad y es por los osteoclastos, por eso se utiliza como marcador de osteoclastos aunque los macrófagos también pueden expresarlo (5) (70).

La enzima TRAP interviene en la degradación de proteínas no colágenas del hueso, sin embargo las fosfatasas ácidas son enzimas encontradas en todos los tejidos del cuerpo, incluyendo leucocitos humanos; estas enzimas hidrolizan ésteres de mono fosfato en un medio ácido. La TRAP tiene una actividad catalítica en pirofosfatos orgánicos (ATP, ADP), pirofosfato de sodio inorgánico, monofosfoésteres de alcoholes aromáticos (1 naftil fosfato y para-nitrofenilfosfato, considerado como el mejor sustrato para la enzima). La fosfatasa ácido resistente a tartrato es detectable en cerumen fisiológico y circunstancias patológicas asociadas al incremento de la resorción ósea.

Hay una correlación entre la expresión de TRAP y el grado de proceso de resorción ósea para los osteoclastos, lo que implica un importante papel de esta enzima en la resorción ósea. Esta afirmación está basada en experimentos en que utilizaron bloqueadores de la enzima y se demostró que la inhibición de esta enzima es acompañada por una marcada reducción de la resorción ósea. Se cree que al ser esta enzima una pirofosfatasa, es probablemente la responsable de la remoción de pirofosfato, potente inhibidor de la solubilización de la apatita, considerado el primer paso esencial en la resorción (70).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad resortiva de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) fusionadas con PEG, fusionadas con PEG y tratadas con NAC, no fusionadas, no fusionadas y tratadas con NAC, tratadas con fuerza centrífuga y tratadas con fuerza centrífuga y NAC.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar marcadores característicos de osteoclastos, en CMNSP fusionadas con PEG, sometidas a fuerza centrífuga, no fusionadas no tratadas con fuerza o tratadas con NAC.
- Evaluar la actividad TRAP, en CMNSP fusionadas con PEG, sometidas a fuerza centrífuga no fusionadas no tratadas con fuerza o tratadas con NAC.
- Evaluar actividad resortiva, en CMNSP fusionadas con PEG, sometidas a fuerza centrífuga no fusionadas no tratadas con fuerza o tratadas con NAC.

5. Materiales y métodos

5.1 Láminas de hueso

Se siguió el protocolo utilizado en la tesis: “Análisis de la actividad resortiva de células fibroblastoides (cultivo primario gingival) luego de someterlas a fuerza tensil o fusionarlas con PEG” (5); el hueso utilizado para esta investigación fue cortical de pelvis bovina (*bos taurus*) láminas de aproximadamente 5 mm de ancho y largo por 0.5 de grueso, este fue cortado con una pulidora con disco de carburo de grano grueso y luego pulidas con micromotor eléctrico, piedra rosada y discos de carbura de grano fino. Estas laminas se sumergieron en una solución de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 10% por 8 horas bajo agitación continua, se lavaron 10 veces con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, posteriormente se esterilizaron con etanol al 70% por 60 minutos y finalmente se lavaron dos veces con medio DMEM suplementado con 10% SFB. Se utilizaron cajas estériles de 48 pozos para proceder al cultivo y que al introducir las láminas óseas fueron llevadas a luz ultravioleta durante un día.

5.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y cultivo

Para la adquisición de las CMNSP se precedió de la siguiente manera:

Se firmó el consentimiento informado (**ver anexo 1**). Se tomó muestra de 10 ml de sangre periférica de un donante voluntario, de 25 años de edad, género masculino, sin antecedentes de alteraciones en el metabolismo óseo, mediante punción en el pliegue anterior del brazo, con una jeringa heparinizada (2 μ l de heparina sódica, 5000 UI en 5 ml. Se realizó dilución 1:1 con medio DMEN y 9 ml se agregaron suavemente sobre un colchón de 3 ml de Ficoll-Hypaque (1:3 v:v) (SIGMA-ALDRICH) (71). Se centrifugó a 1200 r.p.m durante 30 minutos. Mediante una pipeta se tomó la interface opaca que contiene las CMSP. Se depositó en un nuevo tubo. Se realizaron tres lavados con medio DMEN a 1500 r.p.m durante 5 minutos cada uno.

Las células se cultivaron en medio DMEM suplementado en SFB al 10% (v/v), en presencia de fitohematoglutinina-P (PHA-P) 10 μ g/ ml para estimular linfocitos T, en caja de Petri e incubadora a 37°C, 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%. Al cabo de 72h de cultivo las células en suspensión y adherentes fueron recolectadas. Estas últimas se desprendieron con una solución de PBS - EDTA 1mM (p/v) por 10 minutos a 37 °C. Posteriormente, las células fueron lavadas con medio libre de SFB y centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos antes de la fusión.

5.3 División de la muestra

Para proceder a la siembra de las células sobre los huesos se diseñaron 6 grupos, cada uno con **6 láminas** de la siguiente manera: 1. Células no fusionadas (no fu), no tratadas con fuerza (no f) (CONTROL). 2. Células no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL) + NAC. 3. Células no fusionadas + fuerza centrífuga. 4. Células no fusionadas + fuerza centrífuga + NAC. 5. Células fusionadas con PEG. 6. Células fusionadas con PEG + NAC.

5.4 Fusión celular con PEG y fuerza centrífuga

Las células se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante, colocando el tubo sobre gasa estéril para eliminar todo residuo de DMEM y evitar diluir el polietilenglicol (PEG). Se tuvo en cuenta que por cada 1×10^6 células se aplica 50 μ l de PEG1450 al 50% (p/v). Las CMSP aisladas y cultivadas como se mencionó antes, se centrifugaron durante 5 minutos a 700 rpm, se descartó el sobrenadante y se secó el excedente sobre una gasa estéril. Sobre el botón de células se depositaron 50 μ l de PEG 1450 al 50% (p/v), previamente calentado a 37 °C, se agito suavemente, mediante golpes con el dedo en la base del tubo, para homogenizar el botón celular en el PEG y se llevó a 37° C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se adicionó 40 μ l de DMEM cada 60 segundos por 5 minutos, posteriormente 80 μ l de DMEM durante 5 minutos y 160 μ l de DMEM durante 5 minutos siguiendo el protocolo descrito (Moniere-Faugere et al, 2001). Una vez se diluyó el PEG las células se centrifugaron 5 minutos a 700 x g y se lavaron dos veces con DMEM para retirar el PEG y se resuspendió en medio DMEM con SFB al 10%. Para sembrar en cada lámina de hueso cortical bovino estéril, colocadas previamente en cajas de cultivo estériles de 48 pozos se

aplicaron 10 μ l de la suspensión de células fusionadas con PEG en 30 μ l de medio de cultivo. Para que se adhiran las células se dejaron durante 2 horas en incubadora a 37°C, al 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%. Posteriormente se adicionó 400 μ l de medio con SFB al 10% en cada pozo. Para las células tratadas con NAC, se agregó una concentración de 30 mM por pozo de preparado de NAC en PBS, a las 6 horas de realizada la fusión cuando cada pozo alcanzo 400 μ l de medio.

Para las 6 láminas donde se aplicó fuerza centrífuga las células no fusionadas se sembraron sobre la lámina de hueso, como se describió antes. Luego se pusieron en un motor rotatorio horizontal (Rototorque – ColeParmer®) a velocidad No. 10 (60 r.m.p) que permaneció constante durante 5 días en incubadora a 37°C, 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%. Para calcular la fuerza ejercida sobre las células se estableció que fue $9.8 \times 10^{-5} \text{ } 93 \text{ gr/cm}^2$ (72), al aplicar la siguiente fórmula: $P=(m \times r \times \text{r.p.m}^2 \times \pi^2)/(A \times 9.8 \times 900)$. Donde P es la presión en Kg por cm², m: la masa del medio, r: el radio del motor rotatorio, r.p.m: revoluciones por minuto y A: el área de contacto entre el medio y las células. Siendo m= 0.015 gr, r= 0.065m, A=4 cm² y RPM= 60 (5).

Para las células tratadas con NAC, se agregó una concentración de 30 milimolar por pozo de preparado de NAC en PBS, a las 6 horas de realizada la fusión cuando cada pozo alcanzo 400 μ l de medio y se continuo la incubación hasta el día de la cosecha.

Las células se cosecharon fijándolas durante 40 minutos a 4 °C con metanol ácido acético en proporción a 1:3, 1 de ácido acético y 3 de metanol, 15 minutos, pre-enfriado a 0° C y se realizaron tres lavados con 200 μ l de PBS. Luego, se dejaron en 200 μ l de PBS y llevaron al refrigerador a 4 °C. Se evaluó la actividad de la enzima TRAP y la actividad resortiva. Como control se utilizaron el mismo número de CMSP estimuladas con PHA sin fusionar y otro con NAC.

5.5 Marcadores de osteoclasto

5.5.1 Inmunofluorescencia

Para determinar si las CMNSP fusionadas con PEG, sometidas a fuerza centrífuga y tratadas con NAC, expresaban alguno de los marcadores osteoclastogénicos: se realizó inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron anticuerpos policlonales a una concentración de 0.8 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology^R): ADAM12, ATPasa, Integrina β 3 y catepsina K generados en cabra y DCstamp y receptor de calcitonina generados en conejo. Para esto, a las células fijadas cultivadas sobre la lámina ósea se les retira del PBS, se secan la lámina ósea por debajo, con una servilleta. Se agregó a cada lámina ósea 30 µl de la solución con el anticuerpo primario y se incubó durante 1h a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron 3 veces con 200 µl de PBS dejando 5 minutos entre cada lavado. Las láminas óseas se secaron por debajo y se cambiaron de caja. Se agregó a cada lámina ósea 30 µl de la solución con el anticuerpo secundario FITC anti-cabra (2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology^R) junto con la tinción DAPI, y se incubó durante 15 min a 15 °C en cámara húmeda, protegido de la luz. La tinción DAPI se une a la doble hélice en medio del canal menor del DNA, se excita a 358 nm y emite a 461 nm de color azul cuando se ilumina con luz Uv y puede usarse tanto en células vivas como fijadas conjugado en el anticuerpo secundario. Se realizó lavado con 200 µl de PBS cada 5 minutos por 3 veces. La muestra se analizó en un microscopio de fluorescencia (Vanguard®) con un objetivo 100X. Se evaluó toda la superficie de la lámina de hueso y tomaron entre

14 y 24 microfotografías representativas por lámina con cámara Panasonic® DMC-FHS.

5.5.2 Determinación de la fosfatasa ácida resistente al tartrato TRAP

Este procedimiento fue realizado según la metodología descrita en el trabajo de Murillo y colaboradores (4). Las láminas de hueso se dejaron secar al medio ambiente después de retirar el PBS en el que se encontraban. Se inició la preparación de la tinción mezclando: buffer veronal 30 ml que contenía barbitona de sodio (ácido barbitúrico al 0.159 g y 0.33 g de NaOH) y 0.582 g de acetato de sodio. A este buffer veronal se le adicionó 24.36 mg de tartrato de sodio-potasio. Se mezcló por separado la solución formada con 375 µl de pararrosanilina hexasotizada y 375 µl de nitrito de sodio en hielo. Después, se adicionó 0.00475% de naftol fosfato MX-ASB1 (*Sigma-Aldrich*), usado como sustrato de la enzima TRAP. A esta solución se le ajustó el pH a 4.6 usando ácido clorhídrico, ensayo error. Cada lámina recibió 200 µl de esta solución y fueron llevadas a la incubadora a 37 °C durante 1 hora y media, se hizo un solo lavado con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

La coloración TRAP de acuerdo a las concentraciones de los reactivos y de los tiempos de incubación varían entre una coloración rojo ladrillo, café y rojo violeta. Para evaluar la actividad TRAP, se hizo un conteo de las células coloreadas en las láminas de hueso cortical bovino, de cada uno de los grupos evaluados en este proyecto. El conteo se realizó en toda la superficie de la lámina ósea, en un microscopio de luz (Vanguard®), con un objetivo de 40x.

La evaluación de las células multinucleares TRAP positivas fue realizada siguiendo un muestreo aleatorio en forma de W, evaluando y registrando siete campos representativos de toda la lámina. Para esto se utilizó una cámara Panasonic® DMC-FHS adaptada al microscopio.

5.6 Evaluación de la actividad resortiva

Primero se procedió al retiro de las células para poder observar las lagunas de resorción, posterior a la tinción y observación de TRAP, las células fueron lisadas con una solución de NaOCl al 6% y 5.2% de NaCl, (73), bajo agitación continua por 15 minutos. Las láminas se lavaron cinco veces con agua destilada, bajo agitación y suave cepillado. Para la valoración de las lagunas de resorción se realizó la tinción de azul de Coomassie método estándar, para aumentar contrastes en la superficie de las láminas de hueso una vez removidas las células.

Las tinción de azul de Coomassie se realizo con 0.25% Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético 40% H₂O, se aplicaron 400 µl a cada pozo y se dejaron tapados por 10 minutos con agitación leve ocasional. Las láminas de hueso se decoloraron con una mezcla de metanol, ácido acético y agua (50:10:30%, V/V) cambiando varias veces la mezcla hasta que no se desprendiera más colorante y alternando cada lavado de 400 µl con agua destilada, Finalmente se dejaron con 200 µl de la solución para decolorar la tinción en cada pozo. Las láminas fueron secadas con servilleta, sin presionar y al medio ambiente, para realizar el conteo se tomaron quince fotografías representativas con una cámara Panasonic® DMC-FHS; de cada grupo de 6 huesos, se evaluaron con el objetivo 10 y 20 X en un microscopio de luz

Vanguard®, se contó el número de células en cada campo, y se realizó un clasificación para las lagunas de resorción para hacerlo más descriptivo: lagunas grandes y profundas, grandes y superficiales, pequeñas y profundas, y pequeñas y superficiales. Se sumaron los resultados en todas las fotos de cada lamina para los 6 grupos experimentales (PEG, PEG+NAC, no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL) no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL)+NAC, fuerza y fuerza+NAC), al final se sumaron los datos y se dividió en el número total de láminas observadas.

6. Resultados

6.1 Evaluación mediante de la expresión de marcadores osteoclasticos.

Para esta evaluación se realizó inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios policlonales específicos contra las proteínas celulares. Se encontró que en todas las láminas, para todos los anticuerpos evaluados: ADAM12, ATPasa, DCstamp, Integrina $\beta 3$, receptor de calcitonina y catepsina K, presentaron células positivas en la tinción DAPI. La distribución fue irregular, algunas presentaron mayor afinidad por el borde de la lámina ósea (figura 4 C y c), otras muy dispersas sobre toda la lámina, en grupos de pequeño tamaño (figura 4 C), y otras con grupos celulares grandes que se ubicaron cerca al centro de la lámina (Figura 4 A y a),

Algunas láminas presentaron múltiples grupos de células pequeñas, de una distribución relativamente constante, acompañado de algunos grupos grandes. Este patrón se observó principalmente en las láminas sobre las cuales se trataron las células con NAC, entre ellos ADAM-12 tratado con fuerza centrífuga y NAC, ATPasa fusionado con PEG y tratados con NAC, ATPasa no fusionadas tratada con NAC, y Captetina K fusionada con PEG y tratadas con NAC (figura 4 D, E y G y Anexo 2 figuras 6C, 10C, 11C y 13C). Al evaluar la fluorescencia para los diferentes anticuerpos, la mayoría de láminas presentaron pocos grupos celulares positivos para el anticuerpo respectivo (figura 4 d,e y g y Anexo 2 figuras 6D, 10D, 11D y 13D). Sin embargo, fue evidentemente menor la cantidad de grupos celulares, en los grupos tratados con NAC (figura 4 C y c). Algunos de estos grupos tratados con NAC, conservaron la misma forma de los grupos no tratados

con NAC, pero otros cambiaron significativamente de forma y tamaño (figura 4 D y d)

La catepsina K y DC STAMP (figura 4 E y e), fue positivo para las células fusionadas con PEG, fuerza centrífuga y el grupo no fusionado, en los tratados con NAC (figura 4 F y f), se observaron pocos grupos celulares positivos para el marcado (Anexo 2 figuras 11,12 y 13) y (Anexo 2 figura 14, 15 y 16).

Para el marcador de ATPasa (figura 6 C, c ,D y d) casi todos los grupos se encontraban dispersos, tanto en los grupos tratados NAC como en los no tratados. Sin embargo, la inmunofluorescencia con mayor cantidad de grupos celulares positivos fue en los no tratados con NAC.

Al evaluar el marcador DC STAMP, un marcador característico de células fusionadas, se evidencio en los 3 grupos (fusionados con PEG, no fusionados y fuerza centrífuga) grupos celulares de tamaño mediano bastante definidos y positivos para el marcador, a diferencia de los grupos tratados con NAC en los cuales el marcador se observó prácticamente negativo.

Al evaluar el anticuerpo en ATPasa en el grupo sin NAC, se observaron grupos celulares fluorescentes de gran tamaño, respecto a los tratados con NAC. (Anexo 2 figura 10 A y B).

A continuación se presenta una tabla con los grupos celulares más significativos encontrados en la valoración de anticuerpos al microscopio de inmunofluorescencia 100x, se valuó la fluorescencia de grupos grandes y pequeños. Se utilizaron 6 anticuerpos: ADAM12, ATPasa, Catepsina K, DC stamp, integrina β 3 y receptor de calcitonina.

Anticuerpo	PEG	PEG +NAC	FUERZA	FUERZ +NAC	CONTROL	CONTROL +NAC
DAPI	26 (100%)	29(100%)	65(100%)	231(100%)	62(100%)	45(100%)
ADAM12	14 (54%)	5(17%)	10(15%)	25(11%)	23(37%)	16(36%)
DAPI	65(100%)	88(100%)	164(100%)	156(100%)	234(100%)	262(100%)
ATPasa	27(42%)	21(24%)	34(21%)	11(7%)	36(15%)	25(10%)
DAPI	231(100%)	239(100%)	265(100%)	255(100%)	330(100%)	197(100%)
Catepsina K	84(36%)	28(12%)	70(26%)	62(24%)	48(15%)	52(26%)
DAPI	62(100%)	59(100%)	37(100%)	50(100%)	86(100%)	88(100%)
DC stamp	31(50%)	18(31%)	15(41%)	7(14%)	21(24%)	18(21%)
DAPI	193(100%)	253(100%)	457(100%)	168(100%)	398(100%)	291(100%)
integrina $\beta 3$	51(26%)	49(19%)	116(25%)	51(30%)	40(10%)	15(5%)
DAPI	142(100%)	234(100%)	246(100%)	360(100%)	183(100%)	112(100%)
receptor de calcitonina	22(16%)	36(15%)	30(12%)	25(7%)	56(31%)	8 (7%)

Tabla 1. Número de grupos celulares positivos para DAPI (azul) y para anticuerpos (ADAM12, ATPasa, Catepsina K, DC stamp, integrina $\beta 3$ y receptor de calcitonina) (verde), contadas sobre microfotografías de las láminas obtenidas con cámara Panasonic® DMC-FHS adaptada a Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) observadas a 100x para los 6 grupos experimentales (fusionadas con PEG, fusionadas con PEG+NAC, tratadas con FUERZA, tratadas con FUERZA+NAC, no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL), y no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL)+NAC.

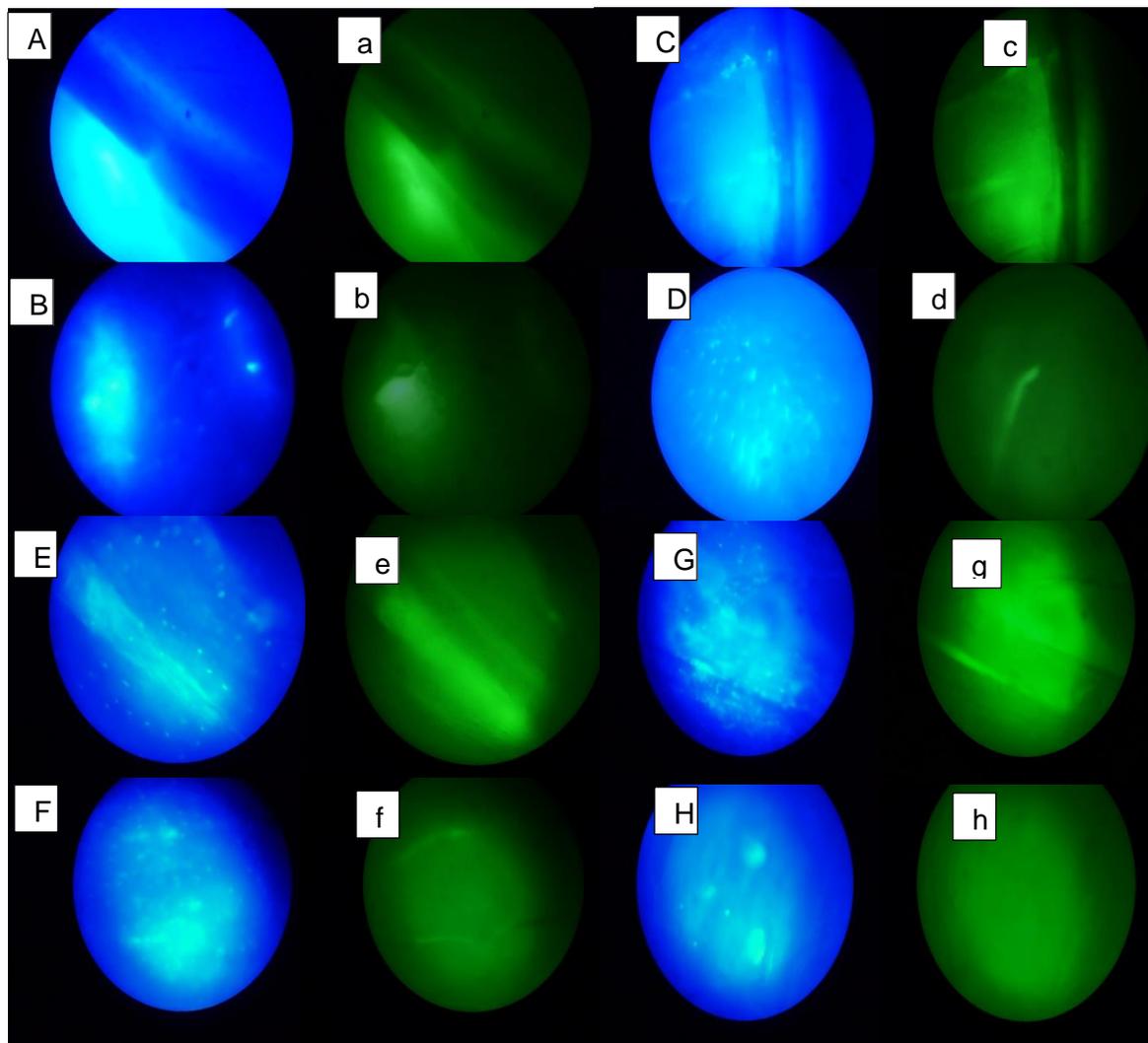


Figura 4. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia de anticuerpos policlonales, a los 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI, y anticuerpos, evaluados al Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) observadas con objetivo de 100x, fotografías con cámara Panasonic®. DMC-FHS A. no fusión no tratadas con fuerza (CONTROL) DAPI, a. no fusión no tratadas con fuerza (CONTROL) anticuerpo para ADAM12. B. no fusión no tratadas con fuerza (CONTROL)+NAC DAPI, b. no fusión no tratadas con fuerza (CONTROL)+NAC anticuerpo para ADAM12. C. fusionadas con PEG DAPI, c. fusionadas con PEG anticuerpo para ATPasa. D. fusionadas con PEG + NAC DAPI d. fusionadas con PEG +NAC anticuerpo para ATPasa, E. tratadas con FUERZA DAPI, e. tratadas con FUERZA anticuerpo para CATEPSINA K. .F tratadas con FUERZA+NAC DAPI f. tratadas con FUERZA +NAC anticuerpo para CATEPSINA K G. tratadas con FUERZA DAPI, g. tratadas FUERZA anticuerpo para INTEGRINA β 3, H. tratadas con FUERZA + NAC DAPI, h tratadas con FUERZA+NAC anticuerpo para INTEGRINA β 3.

6.1 Evaluación de la expresión de la enzima TRAP

Al evaluar la expresión de la enzima TRAP en las CMNSP, fusionadas con PEG, sometidas a fuerzas, no fusionadas y tratadas con NAC a los 5 días de incubación, en las laminas óseas, se identificaron grupos o masas de células con patrones de forma irregulares (unos redondeados, otros amorfos (figura 5 A y D). Algunos grupos captaron mejor el color de la tinción que otros (variando entre color café (figura 5 H) y color rojo ladrillo (figura 5 B y F), en contraste con el color amarillo del hueso normal (figura 5 C). La distribución de los grupos de células sobre las láminas también fue muy variable, algunas laminas presentaron una distribución relativamente uniformemente en toda la lámina; en contraste otras presentaron la mayor cantidad de agrupaciones justo en la periferia de la lámina.

En las láminas óseas donde se cultivaron las células fusionadas con PEG, tratadas con fuerza centrífuga o las no fusionadas ni sometidas a fuerza centrífuga (control) se observaron mayor número de grupos celulares, de mayor tamaño e intensidad en la tinción, sugiriendo mayor número de células TRAP positivas (TRAP+) (Figuras 5, A, B, E, F, I y J). En contraste, en las láminas óseas donde los tres grupos descritos anteriormente fueron tratadas con NAC (Figuras 5, C, D, G, H, K y L) presentaron muy pocos grupos TRAP+, pocos grupos celulares grandes, y se encontró gran parte de la extensión de la lámina sin células (Figuras 5 C y K).

Los grupos tratados con PEG, FUERZA y CONTROL presentaron un total de 568 grupos celulares contados en todas las láminas óseas (192 sobre la lámina de células fusionadas con PEG; 198 donde se aplicó fuerza centrífuga y 178 donde no se fusionó, ni se aplicó fuerza) y en los mismos tres grupos, las láminas que fueron tratadas con NAC, presentaron un total de 233 grupos TRAP+ (75, 91 y 52

respectivamente, figura 6). En estas últimas láminas se identificó que los grupos celulares tendían a ser uniformes en la distribución, es decir, se observaban grupos pequeños y separados con el mismo patrón en toda la lámina (figura 5 K). Las no tratadas con NAC presentaron grupos grandes y de fuerte tinción TRAP+ y las células se observaban en toda la lámina e incluso dos láminas presentaron una tinción uniforme que daba la apariencia de ser una sola agrupación celular (Figura 5 B y F).

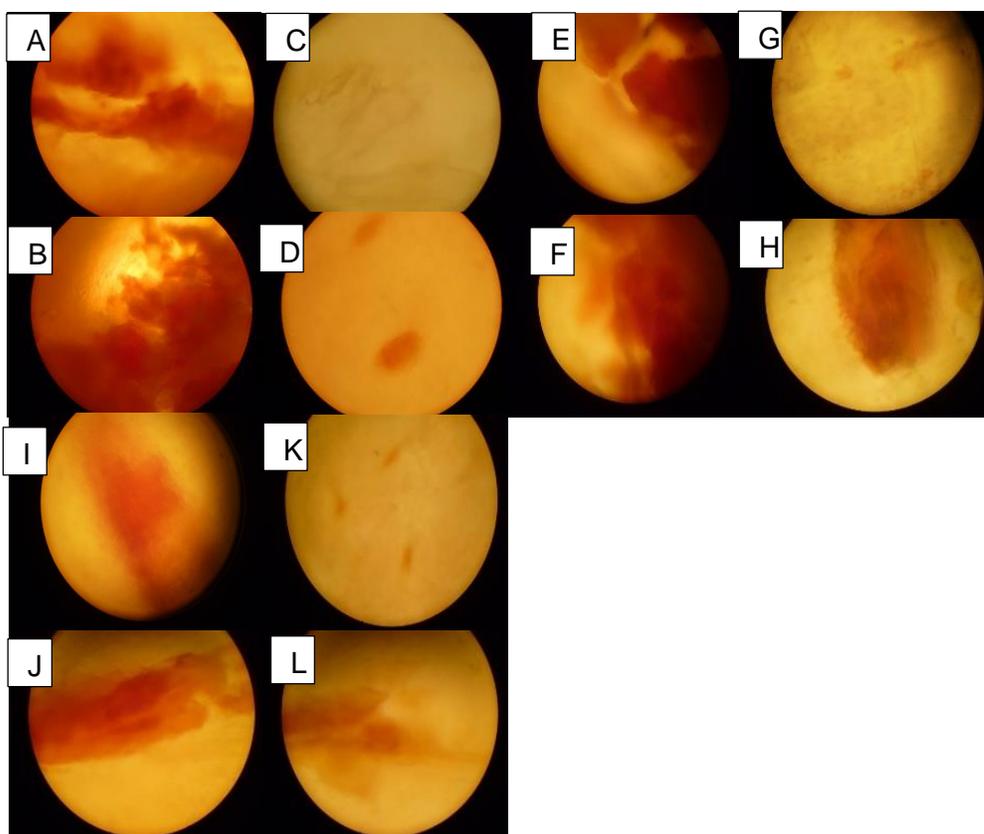


Figura 5. Láminas óseas representativas de células con tinción TRAP positivas, luego de 5 días de cultivo, microscopio de luz (Vanguard®), 40X, A, B fusionadas con PEG, y C, D fusionadas con PEG+NAC, E, F tratadas con fuerza centrífuga, G,H fuerza centrífuga + NAC, I, J no fusionadas no tratadas con fuerza (control) y K, L no fusionadas no tratadas con fuerza (control)+ NAC.



Figura 6. Número de agrupaciones celulares TRAP positivos, luego de 5 días de cultivo sobre láminas óseas. Las láminas fueron observadas y contadas en un microscopio (Vanguard®), 40X. Células fusionadas con PEG, fusionadas con PEG+NAC, tratadas con fuerza centrífuga, fuerza centrífuga + NAC, no fusionadas no tratadas con fuerza (control) y no fusionadas no tratadas con fuerza (control) + NAC.

6.2 Evaluación de la actividad resortiva

Para observar las zonas de resorción sobre las láminas óseas, las células fueron retiradas como fue descrito en materiales y métodos, y las lagunas de resorción se observaron mediante contraste con la tinción azul de Coomassie.

Se observaron formas muy variadas al microscopio de luz (10 y 20 X, Vanguard®) con formas irregulares. Algunas presentaban patrones redondeados que asemejan la forma de las células (Figura 7 A y E flecha roja). Algunas laminas captaron mejor el color (figura 7B, 7 I y J) y otras poco (figura G y H).

Para clasificar las lagunas de resorción se dividieron en 4 grupos:

1. Grandes y profundas (figura 7 A flecha azul)
2. Grandes y superficiales (figura 7 B flecha verde)
3. Pequeñas y profundas (figura 7 A flecha roja)
4. Pequeñas y superficiales (figura 7 E flechas rojas)

Las láminas de hueso del grupo celular fusionado con PEG (Figura 7 A y B, Anexo 2 Figuras 23 A, B y C), presentaron las imágenes con lagunas de resorción más definida, de mayor tamaño y profundidad. En general todas las superficies de las láminas con células fusionadas con PEG presentaron lagunas de resorción. Las láminas de hueso tratadas con fuerza centrífuga, presentaron grandes cantidades de lagunas de resorción pero muy pequeñas y superficiales, algunas estaban cercanas entre sí, dando una apariencia de racimo (figura 7, flecha roja). Los grupos tratados con fuerza más NAC, no presentaron lagunas de resorción, en toda su extensión (Figura 7 H).

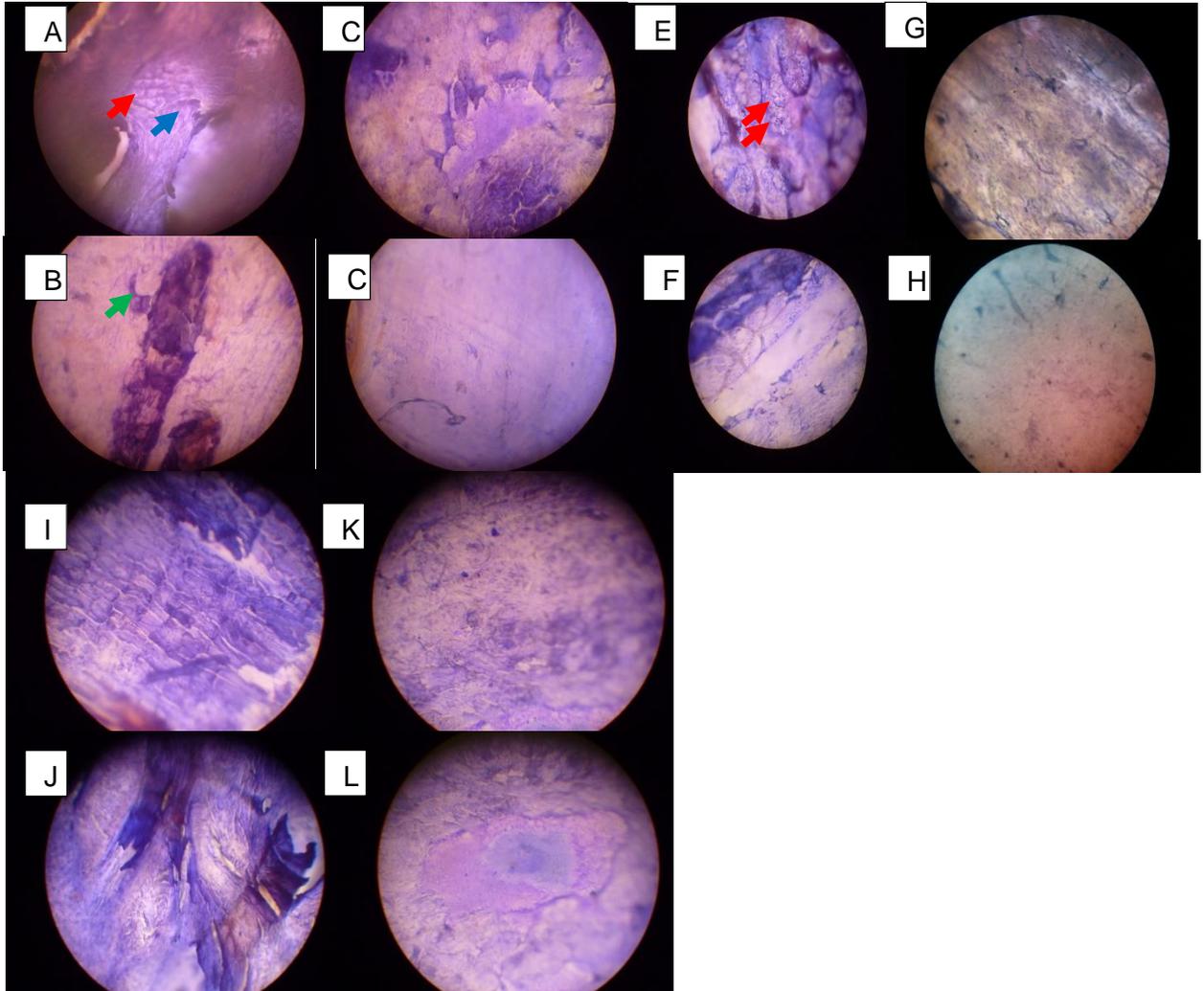


Figura 7. Microfotografías representativas de lagunas de resorción tinción Coomasie, a los 5 días de cultivo. Observadas a microscopio de luz (Vanguard®) objetivo de 10x, fotografías con cámara Panasonic® DMC-FHS. A, B fusionadas con PEG, y C, D fusionadas con PEG+NAC, E, F tratadas con FUERZA, G,H tratadass con FUERZA+NAC, I, J no fusionadas, no tratadas con fuerza (CONTROL) y K, L no fusionadas, no tratadas con fuerza (CONTROL)+NAC.

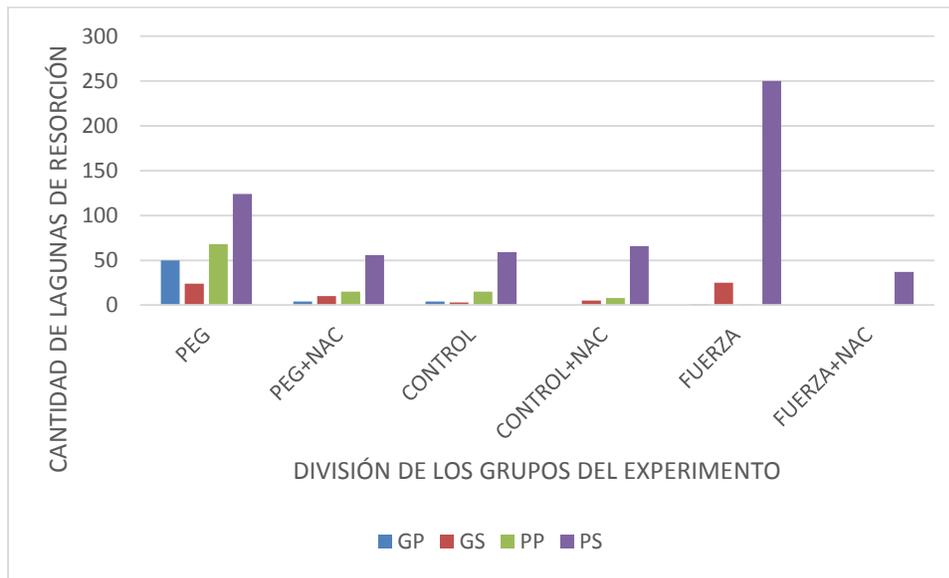


Figura 8. Número de lagunas de resorción contadas en microfotografías obtenidas con cámara Panasonic® DMC-FHS de láminas óseas con tinción Coomasie, a los 5 días de cultivo (objetivo 10X, Vanguard®). Fusionadas con PEG, fusionadas con PEG+NAC tratadas con FUERZA, tratadas con FUERZA+NAC, no fusionadas, no tratadas con fuerza (CONTROL) no fusionadas, no tratadas con fuerza (CONTROL)+NAC. GP: grandes y profundas. GS: grandes y superficiales. PP:pequeñas y profundas PS: pequeñas y superficiales

Al evaluar la tinción para resorción, se evidencio mayor número de lagunas de resorción grandes y profundas en el grupo celular fusionado con PEG: 50, pequeñas y profundas 68 y pequeñas y superficiales 124; el grupo de PEG+NAC presento algunas lagunas grandes y profundas: 4 y un poco más de grandes y superficiales: 10, pero casi una cuarta parte menos de lagunas profundas y superficiales: 56 al compararlo con el grupo PEG sin NACC; El grupo de fuerza centrífuga presento el mayor número de lagunas pequeñas y superficiales: 250 y solo se identificó un una laguna grande y profunda, aunque presento 25 grandes y superficiales, en fuerte contraste el grupo tratado con fuerza centrífuga mas NAC, solo presento lagunas pequeñas y superficiales: 37, El grupo sin PEG y sin Fuerza (control) presentó principalmente lagunas pequeñas y superficiales: 59 y

pocas lagunas grandes: 7; en este mismo grupo tratadas con NAC, se encontraron más lagunas pero todas pequeñas y superficiales: 66.

Se encontró mayor número de lagunas en general en los grupos fusionados con PEG y tratados con fuerza que en el grupo control (sin PEG, sin fuerza), y menor aún para los mismos grupos pero tratados con NAC.

7 Discusión

El objetivo de este estudio era evaluar la actividad resortiva de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) fusionados con PEG o sometidas a fuerza centrífuga, luego de tratarlas con un agente antioxidante, NAC. Como control se utilizaron células no fusionadas y no fusionadas y tratadas con NAC.

Los resultados obtenidos en relación a los marcadores característicos de células con actividad de osteoclasto (actividad TRAP y resorción ósea) fueron similares a lo descrito por Murillo (4), Manrique (44) y Castillo (45). Igualmente, los resultados relacionados a la aplicación de fuerzas centrífugas a células sembradas sobre láminas óseas son similares a los obtenidos por Pasos (5). Todos los anteriores investigadores realizaron su trabajo en células diferentes a las células empleadas en este trabajo. Igualmente, todos realizaron su trabajo en el laboratorio de biología celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional, donde se realizó este trabajo. Lo nuevo del presente trabajo radica en aplicar la fuerza tensil (fuerza centrífuga) a células mononucleares de sangre periférica y encontrar que el tratamiento con un agente antioxidante como NAC disminuye los efectos relacionados con la actividad resortiva cuando se aplica a las células fusionadas con PEG o sometidas a fuerza centrífuga.

La NAC es un derivado N-Acetil del aminoácido L-cisteína, que actúa como mucolítico, secretolítico y fluidificante de las secreciones. Es de venta libre y utilizada desde recién nacidos hasta en ancianos. Los antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC) se han utilizado como herramientas para investigar el papel de especies radicales de oxígeno, ROS (“reactive oxygen species”), en numerosos procesos biológicos y patológicos. NAC inhibe la activación de c-Jun, p38 MAP quinasa, la proteína-1 sensible a actividades redox y al factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB) que regulan la expresión de numerosos genes. NAC modifica directamente la actividad de varias proteínas por su actividad reductora. NAC tiene valor terapéutico para la reducción de la disfunción

endotelial, inflamación, fibrosis, invasión, la erosión del cartílago, la desintoxicación del fármaco acetaminofén y prolongación de trasplantes.

Se ha reportado que durante la actividad del osteoclasto o de células similares a osteoclastos, se aumentan las ROS. Esto se logró demostrar en cultivos celulares de sangre periférica en presencia del factor RANKL. Se encontró que al aumentarse la actividad de NF κ B, por acción de RANKL sobre RANK, se aumenta la actividad de la enzima NOX (NADPH oxidase) y SOD (superóxido dismutasa), proteínas que conducen a la formación ROS. Cuando se aplica al cultivo celular NAC se inhibe la respuesta de las células al RANKL, incluyendo la producción de ROS, inhibe la diferenciación de osteoclastos o disminuye su función resortiva. Aunque en este trabajo no se midió la expresión de ROS, un trabajo paralelo que se desarrolla en el mismo laboratorio, utilizando una línea celular tumoral, U937, encontró aumento de ROS luego de la fusión celular o de la aplicación de fuerza tensil al cultivo. Al aplicar NAC se redujo la expresión de ROS e igualmente se redujo la actividad resortiva. Esto nos permite confirmar que también tendría la misma actividad sobre osteoclastos in vivo, como ya fue reportado en otros estudios sobre ratones (74) (50).

La presencia de células con marcadores positivos en el grupo control se puede justificar con el hecho que todas las células mononucleares de sangre periférica posterior a su adquisición pasaron a un cultivo con estimulación mitogénica con FHA, la cual fue reportado por Böyum desde 1968 que puede ser también una inductora de osteoclastogenesis a partir de linfocitos T, actuando a través del RANKL, (47) (71), adicionalmente, otros mecanismos para la estimulación de diferenciación y actividad de los osteoclastos diferente al realizado por el RANKL, fue propuesto por Rifas donde se evidencia la producción de SOFAT (Secreted osteoclastogenic factor of activate T Cell), la cual fue evaluada sobre monocitos de ratón de la línea RAW 264.7 y demostraron que al ser estimulados con

SOFAT expresan marcadores osteoclastogénicos como integrina $\alpha\beta3$, captasina K y anillos de actina aun cuando dichas células se estimulan simultáneamente con OPG, demostrando que esta citoquina estimula la formación de células similares a osteoclastos y no está mediada por RANK (27).

Las lagunas de resorción del grupo tratado con fuerza, fueron muy numerosas pero muy pequeñas y superficiales, lo que sugiere que las células así estuviesen juntas y presentaran patrones de resorción en forma de racimo, no estaban fusionadas o se fusionaron pocas, este mismo hallazgo estuvo presente los resultados Pazos (5).

Lo encontrado en este estudio se podría considerar un piloto para futuras investigaciones, y considerar posibles aplicaciones clínicas, para utilizar en pacientes en la fase de retención postortodóntica, evitar o controlar resorción radicular, realizar anclaje o en otras alteraciones que involucren metabolismo óseo como procesos infecciosos/inflamatorios entre ellos la periodontitis. NAC no presenta los efectos adversos de otros medicamentos que se han propuesto o estudiado con objetivos similares, entre ellos los bifosfonatos, que pueden presentar osteonecrosis y particularmente en mandíbula. La acción de NAC es temporal (vida media de 6 horas) y no presenta una acción tan larga como los bifosfonatos, dado que una vez fijados a la hidroxiapatita en hueso pueden permanecer y recircular hasta por 10 años (75) (76). El uso de ranelato de estroncio presenta efectos similares a los encontrados en los bifosfonatos sin tanta permanencia, pero este medicamento ha sido reevaluado por su gran riesgo cardiovascular reportado desde 2013 y prohibido en algunos países (77) (78).

La actividad y expresión de marcadores de un cultivo celular obedecerá al estímulo que se realiza sobre estas y del sustrato en el cual se cultiva, los resultados de este estudio en donde se parte de células mononucleares de

sangre periférica, sometidas a los procedimientos descritos, para finalmente obtener células con actividad osteoclastica, refuerzan el concepto de plasticidad celular, y que una célula puede cumplir funciones diferentes dependiendo del estímulo que reciba y del medio en que se encuentre, como ya fue presentado por autores como Lensch y colaboradores en 2012 y Leda en 2013 de una forma más general (13) (15).

8 Conclusión

Fusionar células con PEG, o aplicar fuerza centrífuga a células no fusionadas, inducen marcadores característicos de células osteoclasticas y actividad resortiva, probablemente relacionado con un aumento de ROS, dado que al aplicar NAC los marcadores y la actividad resortiva disminuyen.

9. Recomendaciones

En futuras investigaciones in vitro con células derivadas de sangre periférica, realizar valoración de ROS y su relación con mecanismo de acción de la NAC.

Para tener una mejor valoración al microscopio se recomienda ser muy exigente en la preparación de las láminas de hueso, ya que a menor volumen y más planas, eran más fácil de enfocar el objetivo en el microscopio y por ello de las que mejores registros se podían obtener.

Realizar toda la fase experimental descrita en este estudio con otras poblaciones celulares, como puede ser fibroblastos o células madre de ligamento periodontal, encía marginal y pulpa dental, estos resultados sumados a los ya evaluados en esta tesis y en anteriores, puede dar el soporte para iniciar una fase experimental in vivo y aplicación clínica en pacientes.

Se podría utilizar microscopía electrónica de barrido para observar las lagunas de resorción, con la posibilidad de realizar medidas y valorar con mayor precisión cantidad y actividad de las células osteoclastoides sobre las láminas de hueso, también se podría realizar una comparación de varios tiempos de cultivo.

Bibliografía

1. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999. 20: 345-57.
2. Faust J, Lacey DL, Hunt P, Burgess TL, Scully S, Van G, Eli A, Qian Y, Shalhoub V. Osteoclast markers accumulate on cells developing from human peripheral blood mononuclear precursors. *J Cell Biochem*. 1999. Jan 1;72(1):67-80. .
3. Edwards JR, Sun SG, Locklin R, Shipman CM, Adamopoulos IE, Athanasou NA, Sabokbar A. LIGHT (TNFSF14), a novel mediator of bone resorption, is elevated in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006. May;54(5):1451-62.
4. Murillo A, Guerrero C, Acosta O, Cardozo C. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol Res* 2010, 43: 205:224.
5. Pazos Valencia LB. Análisis de la actividad resortiva de células fibroblastoides (cultivo primario gingival) luego de someterlas a fuerza tensil o fusionarlas con PEG. Bogotá, 2013. Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Ortodonci.
6. Aitken CJ, Hodge JM, Nishinaka Y, Vaughan T, Yodoi J, Day CJ, Morrison NA, Nicholson GC. Regulation of human osteoclast differentiation by thioredoxin binding protein-2 and redox-sensitive signaling. *J Bone Miner Res*. 2004 Dec;19(12):2057-64.
7. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation.. *Blood*. 2005 Aug 1;106(3):852-9.
8. Purroy J, Spurr NK. Molecular genetics of calcium sensing in bone cells. *Human Molecular Genetics*, 2002; Vol. 11, No. 20 2377–2384.
9. Ardila E, Ballesteros JV, Socha M, Serrano AK. Avances en Biología Osea: El Osteoclasto. 1999, Rev Fac Med UN Col. , Vol. 47 (4):, págs. 217-220.
10. Qin A et al. V-ATPases in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (2012) 1422– 1435.
11. Suda, T, Takahashi, N., and Martin, T.J. Modulation of osteoclast differentiation. *Endo. Rev*. 1992-; 13: 66–80.

12. **Rojas. Fagocitosis. En Beatriz Aristizabal. Inmunología de Rojas Edición 16. Medellín Colombia. Editorial CIB. 2012. Pag 37-53.**
13. **Lensch MW, Mummery CL. From stealing fire to cellular reprogramming: a scientific history leading to the 2012 nobel prize. Stem Cell Reports. 2013 Jun 4;1(1):5-17.**
14. **Musunuru K. Genome editing of human pluripotent stem cells to generate human cellular disease models. Dis Model Mech. 2013 Jul;6(4):896-904.**
15. **Ieda M. Direct reprogramming into desired cell types by defined factors. Keio J Med. 2013;62(3):74-82.**
16. **Definición de reabsorción disponible en: <http://definicion.de/reabsorcion/>.**
17. **Definición de resorción disponible en: Definición de reabsorción - Qué es, Significado y Concepto <http://definicion.de/reabsorcion/#ixzz3YdSkxWrn>.**
18. **Del Nero-Viera, Guillermo. Resorption as an inflammatory process. An approach to the pathogenesis of dental and periodontal resorptions RCOE, 2005, Vol 10, N°5-6, 545-556.**
19. **Definición de resorción y reabsorción disponible en: <https://espanol.answers.yahoo.com/question/index?qid=20071015071235AA9zJy9>.**
20. **Roodman G. David . Cell biology of the osteoclast. 1999 Experimental Hematology. 1999, 27: 1229–1241.**
21. **Anderson RE, Woodbury DM. Humoral and ionic regulation of osteoclast acidity. Calcif Tissue Int. 1986 oct; 39 (4):252-8.**
22. **Yasutaka Yamada, Atsuo Ito, Masataka Sakane, Shumpei Miyakawa, Toshimasa Uemura. Laser microscopic measurement of osteoclastic resorption pits on biomaterials. Materials Science and Engineering C 2007. 27, 762-766.**
23. **Blair H, Schlesinger P, Ross F, Teitelbaum S. Recent advances toward understanding osteoclast physiology. Clin Orthop Relat Res 1993, 294:7–22.**
24. **Anne Fouque-Aubert*, Roland Chapurlat. Influence of RANKL inhibition on immune system in the treatment of bone diseases. Joint Bone Spine. 2008 Jan;75(1):5-10.**
25. **Cheng ML, Fong L. Effects of RANKL-targeted therapy in immunity and cáncer. Front Oncol. 2014 Jan 7;3:329.**
26. **Taishin Akiyama, Miho Shinzawa, Nobuko Akiyama. RANKL-RANK interaction in immune regulatory systems. World J Orthop 2012 September 18; 3(9): 142-150.**

27. Rifas L, Weitzmann M, Neale A. A Novel T Cell Cytokine, Secreted Osteoclastogenic Factor of Activated T Cells, Induces Osteoclast Formation in a RANKL-Independent Manner. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 2009, Vol. 60, No. 11, pp 3324–3335.
28. Dai S-M, Nishioka K, Yudoh K. Interleukin (IL) 18 stimulates osteoclast formation through synovial T cells in rheumatoid arthritis: comparison with IL1 β and tumour necrosis factor α . *Ann Rheum Dis* 2004;63:1379–1386.
29. Imagen de RANK, RANKL Y OPG, disponible en:
<https://www.google.com.co/search?q=rankl&espv=2&biw=1366&bih=599&tbm=isch&imgil=xZtxefBXC19O6M%253A%253BPavL6dJ8MNsURM%253Bhttp%25253A%25252F%25252Fwww.nature.com%25252Fbonekey%25252Fknowledgeenvironment%25252F>
52.
30. Kalajzic Z, Peluso EB, Utreja A, Dymant N, Nihara J, Xu M, Chen J, Uribe F, Wadhwa S. Effect of cyclical forces on the periodontal ligament and alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2014 Mar;84(2):297-303.
31. Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod.* 2008 Jun;30(3):299-306.
32. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Apr;129(4):469.e1-32.
33. Chaison JB, Chen CS, Herring SW, Bollen AM. Bone volume, tooth volume, and incisor relapse: a 3-dimensional analysis of orthodontic stability. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010 Dec; 138(6):778-86.
34. Uribe G. Ortodoncia y reabsorción radicular. En: *Ortodoncia teoría y clínica. Corporación para Investigaciones Biológicas.* 1ª Ed. 2004. 190.
35. Silva L, Generoso R, Costa M, Pazzini C. Short-root anomaly in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;138:346-348.
36. Gunraj M. Dental root resorption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:647-53.
37. Abaubara A. Aspectos biomecánicos de la reabsorción radicular externa en terapia ortodóntica. *Odontología clínica.* 2008: 121-125.
38. Díaz C y cols. Reabsorción radicular y fuerzas de Ortodoncia. Trabajo de grado. *ASODIN.* 2008.

39. Pacifici R. *The immune system and bone*. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Nov 1;503(1):41-53.
40. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. *Science*. 2010 Feb 5; 327(5966):656-61.
41. *Instrucciones Ficoll-Paque Plus: 71-7167-00 AD, 2002-06, p1-p4 (Amersham Biosciences)*, disponible en http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge17144002?lang=en®ion=CO&gclid=CM_8rLnk8cECFQ9p7AodeU8AXg.
42. "Intruction manual" Leucosep® 227290, Greiner Bio-one. disponible en: www.gbo.com/bioscience.
43. <http://aactg.s-3.com/pub/download/labmanual/12-ALM-Specimen-Processing.pdf>.
44. Manrique E. G. *Evaluación del efecto de fármacos antirresortivos en el fenotipo y actividad resortiva de células mononucleares de sangre periférica humanas fusionadas con polietilenglicol*. Bogotá 2007. Tesis para obtener el título de Maestría.
45. Castillo LM. *Evaluación de la expresión y fosforilación de csrc, syk y el rearreglo de actina asociados con la actividad resortiva de cmnsp fusionadas con polietilenglicol*. Bogotá, 2010, tesis para optar por el título de maestría en Bioq.
46. Wei F, Wang C, Zhou G, Liu D, Zhang X, Zhao Y, Zhang Y, Yang Qifengc *The effect of centrifugal forcé on the mRNA and protein levelsof ATF4 in cultured human periodontal ligament fibroblasts*. *Archives of oral biology*. 2008; 53: 35– 43.
47. Lorenzo JA, Sousa SL, Alander C, Raisz LG, Dinarello CA. *Comparison of the bone-resorbing activity in the supernatants from phytohemagglutinin-stimulated human peripheral blood mononuclear cells with that of cytokines through the use of an antiserum to il. 1164-70., s.l. : Endocrinology, 1987 Sep, Vol. 121(3):.*
48. Kotake S, Udagawa N, Hakoda M, Mogi M, Yano K, Tsuda E, et al. *Activated human T cells directly induce osteoclastogenesis from human monocytes: possible role of T cells in bone destruction in rheumatoid arthritis patients*. *Arthritis Rheum* 2001; 44:100.
49. Weitzmann MN, Cenci S, Rifas L, Haug J, Dipersio J, Pacifici R. *T cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-dependent and -independent mechanisms*. *J Bone Miner Res* 2001;16:328–37.

50. *N-acetylcysteine Introduction. Alternative Medicine Review. Volume 5, Number 5. 2000. Disponible en: <http://www.altmedrev.com/publications/5/5/467.pdf>.*
51. *Jussi MH, Seija R, Jari JS, Sakamuri VR, David RT, Hentunen, Petri PL, et al. Intracellular Fragmentation of Bone Resorption Products by Reactive Oxygen Species Generated by Osteoclastic Tartrate-resistant Acid Phosphatase. J. Biol. Chem. 1999; 274 (33):.*
52. *Boni, L. T., Stewart, T. P., Alderfer, J. L., and Hui, S. W. 1981. Lipidpolyethylene glycol interactions. II. formation of defects in bilayers. En: J. Membr. Bio. Vol. 62,. p. 71-77.*
53. *Hui, S.W., Kuhl, T.L., Guo, Y.Q, Israelachvili, J. 1999. Use of poly (ethylene glycol) to control cell aggregation and fusion. En: Coll. Surf. B. Bioin. Vol. 14,. p. 213–222.*
54. *Wojcieszyn, J.W,. et al. Studies on the Mechanism of Cell Fusion Using Fluorescent Probes Polyethylene Glycol-mediated Membrane and Cytoplasmic. En: J. Cell biology. 1983; 96: 151-159.*
55. *Abu-Amer Y. Advances in osteoclast differentiation and function. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2005 Sep;5(3):347-55.*
56. *Campbell AM. “Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, monoclonal antibody technology”. Editor R.H Burdon y P.H. van Knippenberg. Editorial Elsevier Science Publisher. New York. 1984; 13: 120-134.*
57. *Charles T, Frost H. M. Bone remodeling and its relationship to metabolic bone disease. Springfield, MA. 1973 .*
58. *Loechel F, Fox JW, Murphy G, Albrechtsen R, Wewer UM. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Nov 30;278(3):511-5.*
59. *Miyamoto T1STATs and macrophage fusion. JAKSTAT. 2013 Jul 1;2(3):e24777.*
60. *Duke-Cohan, J.S,. et al. Immunological function in osteoporosis. En: Clin. Immunol. Immunopathol. 1985; 35: 125–129.*
61. *Yao, G.F. et al. Characterization of vacuolar-ATPase and selective inhibition of vacuolar-H(+)-ATPase in osteoclasts. En: Bioche.Bioph. Res. Commun. 2007; 357 (4): 821 – 827.*
62. *Chellaiah M. Regulation of podosomes by integrin $\alpha v \beta 3$ and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling Review Article European Journal of Cell Biology. 2006 Abril; 85 (3–4): 311-317.*

63. **Duong L, Sanjay A, Horne W, Baron R, Rodan G. Integrin and calcitonin receptor signaling in the regulation of the cytoskeleton and function of osteoclasts. Capitulo 9.**
64. **Kukita, T., N. Wada, A. Kukita, T. Kakimoto, F. Sandra, K. Toh, K. Nagata, T. Iijima, M. Horiuchi, H. Matsusaki, et al. 2004. RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. J. Exp. Med. 200:941–946.**
65. **Yagi M et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. Exp Med. 2005 Aug 1;202(3):345-51.**
66. **Beaudreuil J, Sundaravadivel B, Chenais J, Taboulet J, Frenkian M, Orcel P, Jullienne A, Horne W, Vernejoul M, Cressent M. Molecular characterization of two novel isoforms of the human calcitonin receptor. Gene 2004, 343: 143-151.**
67. **Quinn J, Morfis M, Lam H, Elliot J, Kartsogiannis E, Williams E, Gillespie M, Martin T, Sexton P. Calcitonin Receptor Antibodies in the Identification of Osteoclasts. Bone 1999;25 (1): 1-8.**
68. **Muñoz M, GARCÍA R. Catepsina K y resorción ósea. Rev Esp Enferm Metab Oseas. 2006;15:88-9. - vol.15 núm 04.**
69. **Lecaille F, Bromme D, Lalmanach M. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. Biochimie 90 (2008) 208e226.**
70. **Hayman.. Purification and characterization of a Tartrate-Resistant Acid Phosphatase from human osteoclastomas. Biochem. J. 1989. 261: 601-609.**
71. **Böyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand J. Clin Lab Invest. 1968 ; 97 (21): 77.**
72. **Redlich M, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Bar Kana I, Pitaru S, Palmon A. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and β -actin in cultured human periodontal li. 27-32., s.l. : J Periodontal Res., 2004 Feb;, Vol. 39(1):.**
73. **Hamrstrom L, Lindskog. General morphologic aspects of resorption of teeth and alveolar bone. Int Endod 1985. 18, 93-108.**
74. **Zafarullah. M. W. Q. Li, Sylvester J. Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS January 2003. 60; pp 6-20.**
75. **Sánchez A. bifosfonatos: ¿por cuánto tiempo?. Actualiz Osteología 2006; 2(2): 86-88.**

- 76. Aitken CJ1, Hodge JM, Nishinaka Y, Vaughan T, Yodoi J, Day CJ, Morrison NA, Nicholson GC. Regulation of human osteoclast differentiation by thioredoxin binding protein-2 and redox-sensitive signaling. J Bone Miner Res. 2004 Dec;19(12):2057-64.**
- 77. Cannata-Andía JB, Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C. Mecanismo de acción del ranelato . Rev Osteoporos Metab Miner 2010; 2 (Supl 1): S5-S9.**
- 78. Kirschneck C, Wolf M, Reicheneder C, Wahlmann U, Proff P, Roemer P. Strontium ranelate improved tooth anchorage and reduced root resorption in orthodontic treatment of rats EuropeanJournalofPharmacology744(2014)67–75.**

Anexo 1

Consentimiento informado

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN
VOLUNTARIA DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Título del proyecto: Evaluación de la actividad resortiva de CMNSP fusionadas con polietilenglicol (PEG), tratadas con fuerza centrífuga y con N acetilcisteína (NAC)
--

Director del proyecto: Carlos Arturo Guerrero F. MD. MSc. PhD.

Estudiante: Juan Sebastián Bedoya Trujillo.

Organización: Grupo de Investigación: metabolismo óseo del laboratorio de biología molecular y celular de medicina.

Teléfono de contacto: 3165000 Ext: 15052-15053

e-mail de contacto: caguerrero@unal.edu.co

jsbedoyat@unal.edu.co

INVITACIÓN

El grupo de metabolismo óseo del laboratorio de Biología molecular y celular de la facultad de medicina de la Universidad Nacional de Colombia, lo invita a que contribuya con donación de una muestra de sangre de 20 ml a este estudio.

INFORMACIÓN

El laboratorio de biología molecular de la facultad de medicina tiene evidencia que un medicamento que normalmente se usa como mucolítico o para eliminar flemas (n-acetilcisteína o NAC) actúan sobre células que eliminan hueso (osteoclastos), la NAC inhibe la actividad resortiva (perdida de hueso) de un grupo celular conocido como: línea tumoral de monocitos U937 (línea de células del laboratorio de biología molecular de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional), fusionados con PEG (polietilenglicol-medicamento) o sometidos a fuerza centrífuga. Sin embargo, es necesario determinar si esto mismo sucede con células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) (células que hacen parte del sistema inmune o de defensa, son células normales no tumorales que circulan regularmente por el cuerpo). Si los resultados son similares a lo hallado en células U937 apoyaría el uso de NAC en condiciones en que se desee inhibir la resorción ósea en odontología, como: retención en ortodoncia, control de patologías óseas, enfermedad periodontal entre otros. La NAC se puede consumir sin restricción por ser un producto de venta libre y sin daños colaterales; podría utilizarse en enjuague bucal o administración sistémica (ingerirlo), para controlar la actividad resortiva por parte de osteoclastos. Igualmente permitiría proponer o investigar otros agentes con función similar o mayor potencia para disminuir la actividad resortiva. De ser aplicable los resultados contribuirían significativamente al desarrollo del área así como al entendimiento de la biología molecular de los procedimientos clínicos que realizamos.

PROPÓSITO

Para desarrollar el proyecto que pretende evaluar la actividad resorptiva de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) (células que se encuentran en las muestras de sangre sobre la degradación del hueso) fusionados con polietilenglicol (PEG-medicamento) o tratadas con fuerza centrífuga y tratadas con N-acetilcisteína (NAC) (medicamento usado como mucolítico para controlar los tos, de venta libre y sin riesgos o eventos adversos por su consumo) se necesita la colaboración de algunas personas, dado que cada siembra de células se realiza con una nueva muestra de sangre, la evaluación in vitro debe ser repetible y se deben confirmar los resultados hallados en todas, deberán realizarse varias siembras entre 2 y 5 por lo que les proponemos su participación, con el fin de contribuir a las investigaciones de interés terapéutico en resorción ósea, inicialmente en relación a odontología.

Es adicionalmente muy importante que tenga en cuenta que esta toma de muestra de sangre **NO REPRESENTA PELIGRO ALGUNO para usted, ni ahora ni a futuro**. La muestra será manipulada bajo la normatividad ética enunciada en la resolución 008430 capítulos IV de 1993 expedida por el Ministerio de Salud.

SU PAPEL DENTRO DEL PROYECTO

Siendo voluntario para donar una muestra de sangre, usted estará de acuerdo con lo siguiente:

Usted permitirá que la muestra de sangre sea usada exclusivamente dentro del proyecto mencionado para investigar el uso de la NAC en la inhibición de la resorción ósea por células monucleares de sangre periférica obtenidas en esta muestra.

LOS POSIBLES BENEFICIOS PARA USTED

Su participación en este estudio NO lo beneficiará a usted directamente. Sin embargo, uno de los propósitos de este proyecto es contribuir al conocimiento en el área de las ciencias médicas-odontológicas básicas en Colombia y publicar los resultados para así impulsar a otros grupos a trabajar en las mismas áreas de investigación, con resultados que mejoraran a futuro la calidad de vida de las personas que lo necesiten. Es un beneficio para usted contribuir, aumento del conocimiento en esta área, lo cual podría ayudar al tratamiento de usted o de futuras generaciones con trastornos en el metabolismo óseo.

ALTERNATIVAS DE PARTICIPACIÓN

Tiene usted la LIBERTAD DE NO ACEPTAR esta invitación.

SEGURIDAD

NO hay riesgos físicos como donante a este proyecto de investigación. Por favor tenga en cuenta que la participación y los resultados que se obtengan en este estudio NO modificaran y NO realizaran ninguna intervención sobre usted.

REEMBOLSOS A USTED

NO se le pagará en ningún medio a usted por la donación realizada. La donación es totalmente VOLUNTARIA y ALTRUISTA.

GASTOS

Usted **NO** tendrá que cubrir ningún costo de colección, procesamiento o análisis de la muestra.

CONFIDENCIALIDAD

Su identidad **NO** será revelada en ninguna forma como resultado de su participación en el proyecto. Se conservará la confidencialidad del donante.

PREGUNTAS O DUDAS

Si tiene preguntas o alguna duda sobre esta solicitud o sobre el proyecto en general, por favor remítalas al LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA al Dr. Carlos Arturo Guerrero Fonseca, Médico MSc. PhD. director del proyecto o al Dr. Juan Sebastian Bedoya Trujillo residente de Ortodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia. Teléfono de contacto 3165000 Ext: 15052-15053.

SU FIRMA ABAJO INDICA QUE USTED HA LEÍDO Y ENTENDIDO EL CONSENTIMIENTO INFORMADO, QUE HA TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER PREGUNTAS Y QUE ESTAS HAN SIDO CONTESTADAS DE FORMA SATISFACTORIA, QUE SE LE HA DADO LA INFORMACIÓN MAS PRECISA QUE HA SIDO POSIBLE Y QUE ESTA DE ACUERDO EN PARTICIPAR COMO DONANTE VOLUNTARIO DE UNA MUESTRA DE SANGRE PARA EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN MENCIONADO.

APROBACIÓN DE DONACIÓN VOLUNTARIA

Declaro que:

1. Entiendo que la donación de sangre periférica para este estudio es libre y voluntaria.
2. Entiendo que el procedimiento para la donación de una muestra de 20 ml de sangre **NO** implicará un riesgo adicional a mi salud o representado.
3. Entiendo que la muestra de sangre periférica será usada con fines investigativos
4. Entiendo que mi participación y los resultados que se obtengan en este estudio no representan modificación, ni necesidad de intervención alguna.
5. Entiendo que mi información será manejada de manera confidencial y que será protegida mi identidad.
6. Entiendo que **NO** recibiré ningún estímulo económico por esta donación.
7. He leído y comprendido toda la información entregada, he tenido la oportunidad de formular preguntas y se me han resuelto mis inquietudes.

En consecuencia he decidido libremente realizar la donación de una muestra de sangre periférica.

FECHA: Día: ____ Mes: _____ Año: _____

- Nombre del donante voluntario: _____
- CC donante voluntario: _____
- Teléfono de contacto: _____

- Firma: _____

- Nombre de testigo: _____
- cc testigo: _____
- Teléfono de contacto del testigo: _____

- Firma: _____

- Nombre de quien suministró la información: _____
- cc: _____
- Papel dentro del Proyecto: _____

- Firma: _____

Anexo 2

Microfotografías

Figura 1:

Láminas óseas representativas, tinción TRAP, PEG y PEG+NAC.....80

Figura 2:

Láminas óseas representativas, tinción TRAP, FUERZA y FUERZA+NAC81

Figura 3:

Láminas óseas representativas, tinción TRAP, no fu no f y no fu no f +NAC.....82

Figura 4, tabla 1:

Cantidad de grupos de células para la tinción de TRAP83

Figura 5:

Inmunofluorescencia ADAM12, PEG y PEG+NAC.....84

Figura 6:

Inmunofluorescencia ADAM12, FUERZA y FUERZA+NAC.....85

Figura 7:

Inmunofluorescencia ADAM12, no fu no f y no fu no f +NAC86

Figura 8:

Inmunofluorescencia ATPasa, PEG y PEG+NAC87

Figura 9:

Inmunofluorescencia ATPasa, FUERZA y FUERZA+NAC88

Figura 10:

Inmunofluorescencia ATPasa, no fu no f y no fu no f +NAC89

Figura 11:

Inmunofluorescencia CATEPSINA K, PEG y PEG+NAC90

Figura 12:

Inmunofluorescencia CATEPSINA K, FUERZA y FUERZA+NAC91

Figura 13:	
Inmunofluorescencia CATEPSINA K, no fu no f y no fu no f +NAC	92
Figura 14:	
Inmunofluorescencia DC STAMP, PEG y PEG+NAC	93
Figura 15:	
Inmunofluorescencia DC STAMP, FUERZA y FUERZA+NAC	94
Figura 16:	
Inmunofluorescencia DC STAMP, no fu no f y no fu no f +NAC	95
Figura 17:	
Inmunofluorescencia INTEGRINA B 3, PEG y PEG+NAC	96
Figura 18:	
Inmunofluorescencia INTEGRINA B 3, FUERZA y FUERZA+NAC	97
Figura 19:	
Inmunofluorescencia INTEGRINA B 3, no fu no f y no fu no f +NAC	98
Figura 20:	
Inmunofluorescencia RECEPTOR CALCITONINA, PEG y PEG+NAC	99
Figura 21:	
Inmunofluorescencia RECEPTOR CALCITONINA, FUERZA y FUERZA+NAC	100
Figura 22:	
Inmunofluorescencia RECEPTOR CALCITONINA, no fu no f y no fu no f +NAC	101
Figura 23:	
Láminas óseas representativas, resorción TRAP, PEG y PEG+NAC	102
Figura 24:	
Láminas óseas representativas, resorción, FUERZA y FUERZA+NAC	103
Figura 25:	
Láminas óseas representativas, resorción, no fu no f (CONTROL) y no fu no f (CONTROL)+NAC	104

Microfotografías de la expresión de la enzima TRAP en CMNSP fusionadas con PEG, tratadas con fuerza y no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL), y los mismos tratadas con NAC a los 5 días de cultivo sobre las láminas de hueso.

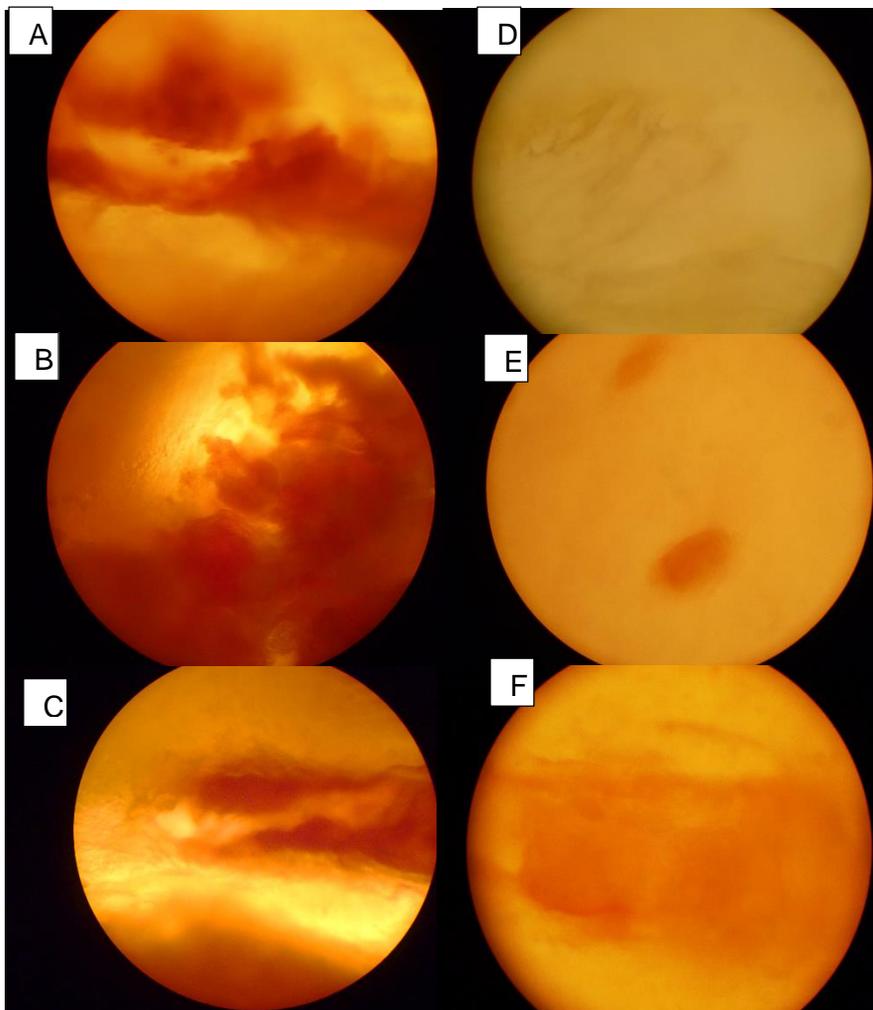


Figura 1. Microfotografías representativas de láminas óseas de células con tinción TRAP positivas, luego de 5 días de cultivo, observadas microscopio de luz (Vanguard®), 40X. A, B y C fusionadas con PEG, y D, E y F fusionadas con PEG y tratadas con NAC.

, A, B fusionadas con PEG, y C, D fusionadas con PEG+NAC, E, F tratadas con fuerza centrífuga, G,H fuerza centrífuga + NAC, I, J no fusionadas no tratadas con fuerza (control) y K, L no fusionadas no tratadas con fuerza (control)+ NAC

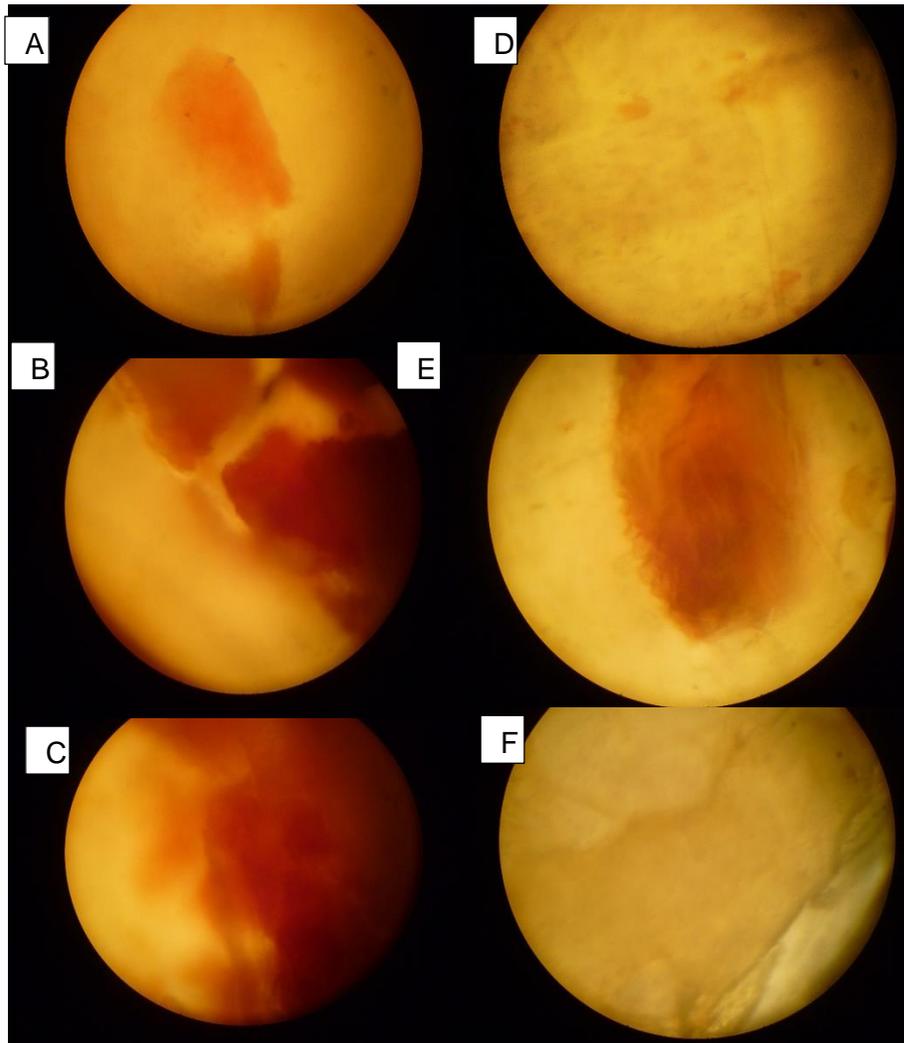


Figura 2. Microfotografías representativas de láminas óseas de células con tinción TRAP positivas, luego de 5 días de cultivo, observadas microscopio de luz (Vanguard®) 40X. A, B y C tratadas con fuerza centrífuga, y D, E y F fuerza centrífuga tratadas con NAC.

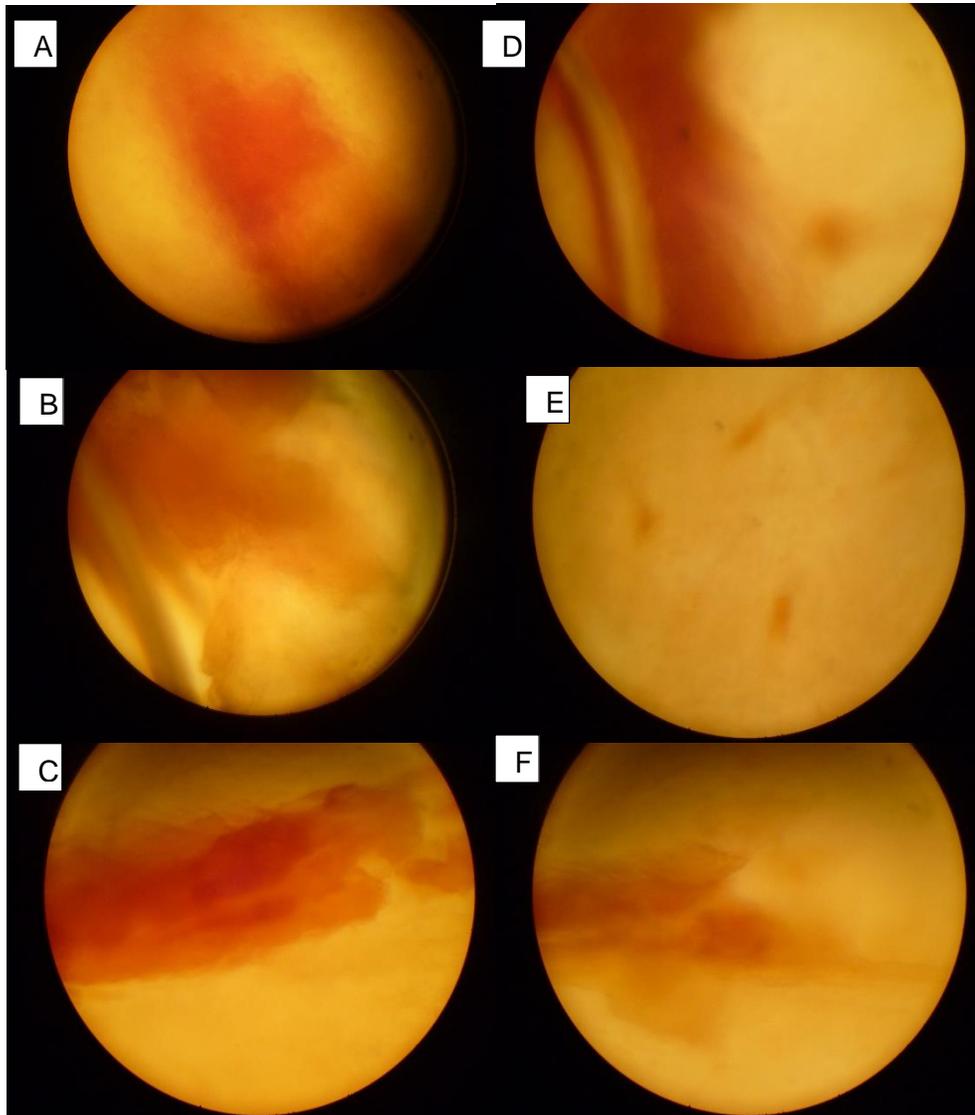


Figura 3. Microfotografías representativas de láminas óseas de células con tinción TRAP positivas, luego de 5 días de cultivo, observadas microscopio de luz (Vanguard®) 40x. A, B y C células no fusionadas, no tratadas con fuerza (control), y D, E y F células no fusionadas, no tratadas con fuerza (control), tratadas con NAC.

TRAP						
	1	2	3	4	5	6
	PEG	PEG +NAC	CONTROL	CONTROL +NAC	FUERZA	FUERZA +NAC
1	30	10	18	12	15	0
2	28	12	24	11	46	11
3	24	10	22	15	15	9
4	49	15	35	10	48	15
5	26	11	41	20	22	12
6	35	17	38	23	52	5
	192	75	178	91	198	52

Figura 4. Tabla 1. Número de grupos celulares TRAP positivos, luego de 5 días de cultivo contados en observación de láminas oseas al microscopio de luz (Vanguard®) 40x con CMNSP: fusionadas con PEG, fusionadas con PEG+NAC, tratadas con fuerza centrífuga, fuerza centrífuga + NAC, células no fusionadas, no tratadas con fuerza (control), y D, E y F células no fusionadas, no tratadas con fuerza (control), tratadas con NAC.

Microfotografías de inmunofluorescencia de la expresión de marcadores osteoclasticos:

ADAM-12

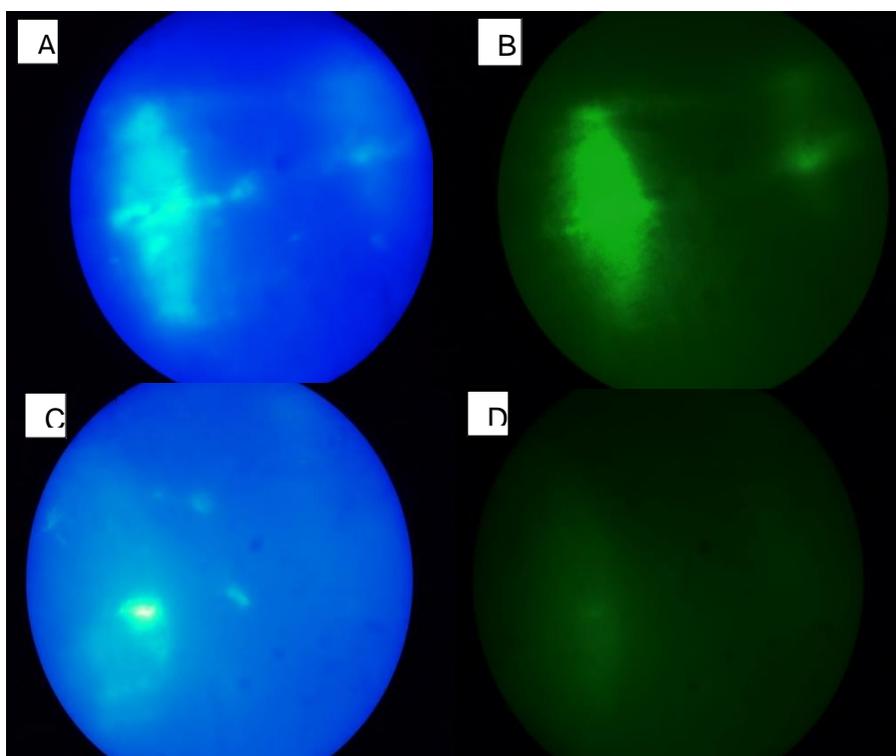


Figura 5. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **ADAM12**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. PEG evaluando DAPI, B. PEG con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **ADAM12**. C. PEG tratado con NAC, DAPI, y D. PEG tratado con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **ADAM12**, en este caso prácticamente negativo.

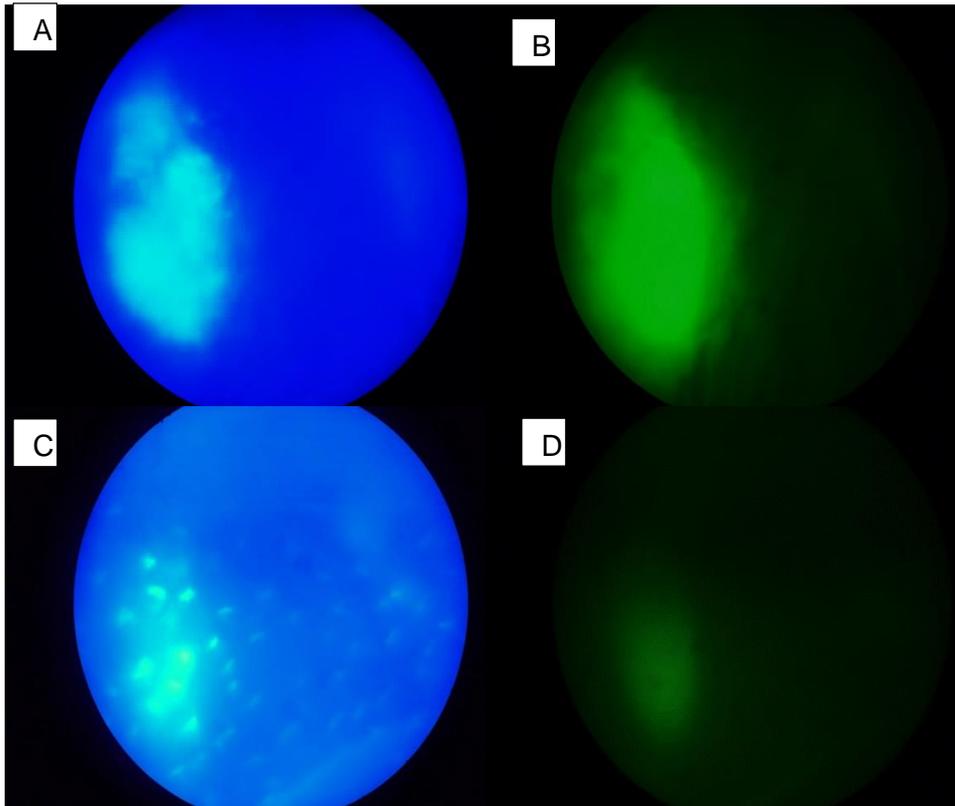


Figura 6. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **ADAM12**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células tratadas con fuerza con DAPI, B. células tratadas con fuerza con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **ADAM12**. C. células tratadas con fuerza y con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **ADAM12**, en este caso prácticamente negativo.

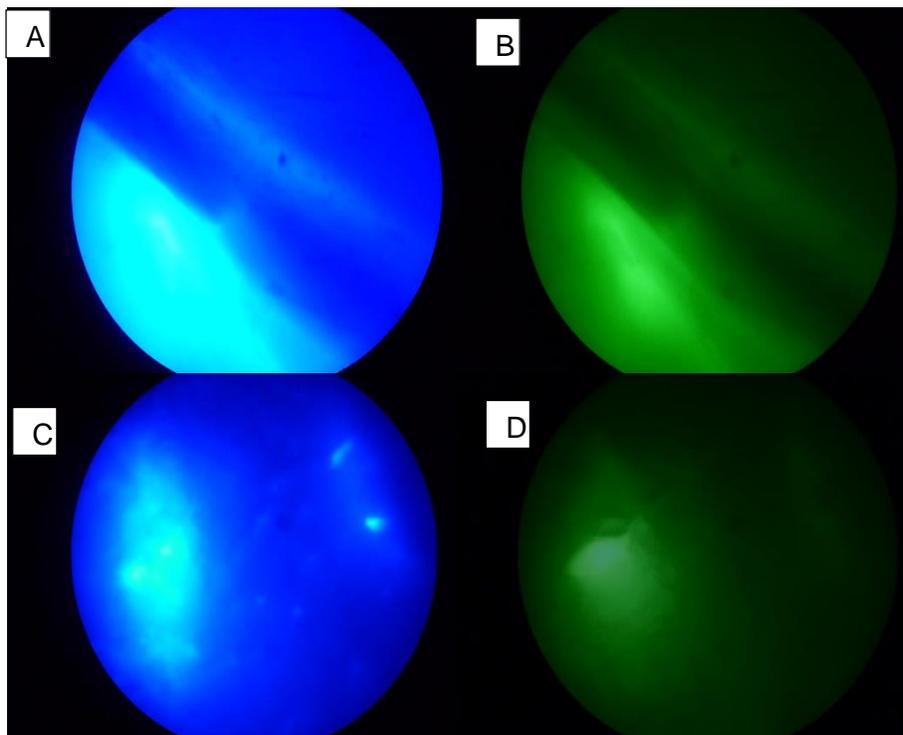


Figura 7. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **ADAM12**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con DAPI, B. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **ADAM12**. C. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **ADAM12**, positivo pero evidentemente de menor tamaño.

ATPasa

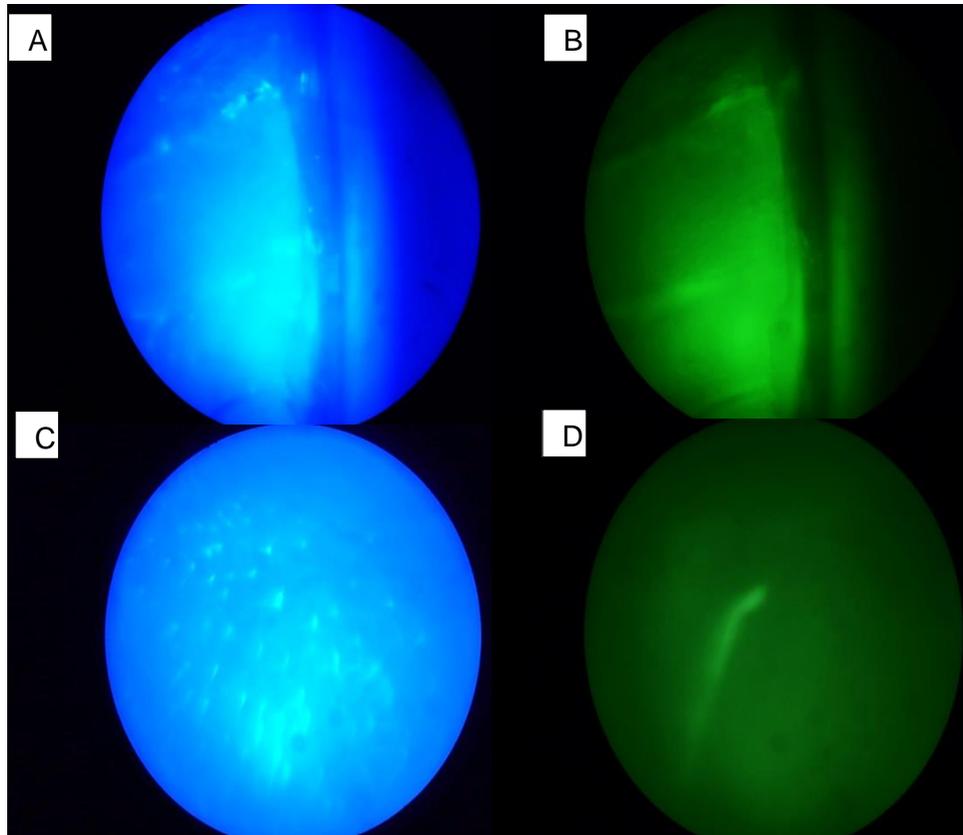


Figura 8. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **ATPasa**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. PEG evaluando DAPI, B. PEG con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **ATPasa**. C. PEG tratado con NAC, DAPI, y D. PEG tratado con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **ATPasa**, obsérvese el contraste con imagen C, mostrando solo un grupo lineal positivo, en comparación a la gran cantidad de células presentes.

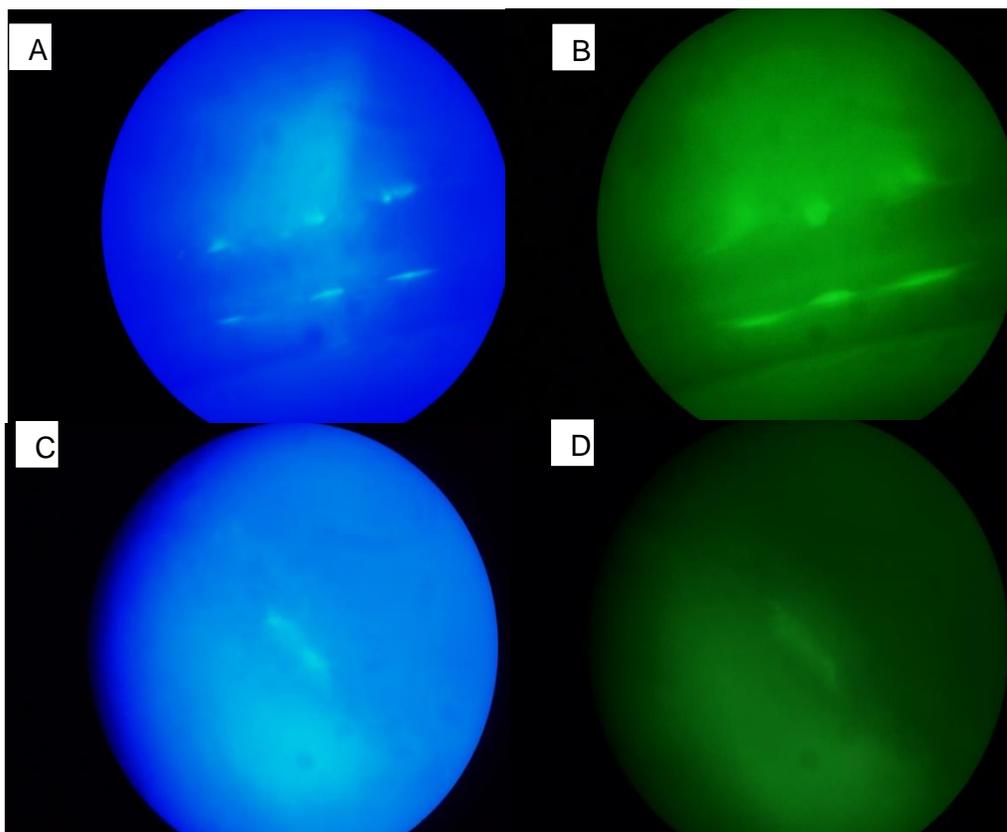


Figura 9. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **ATPasa**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células tratadas con fuerza con DAPI, B. células tratadas con fuerza con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **ATPasa**. C. células tratadas con fuerza y con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **ATPasa**.

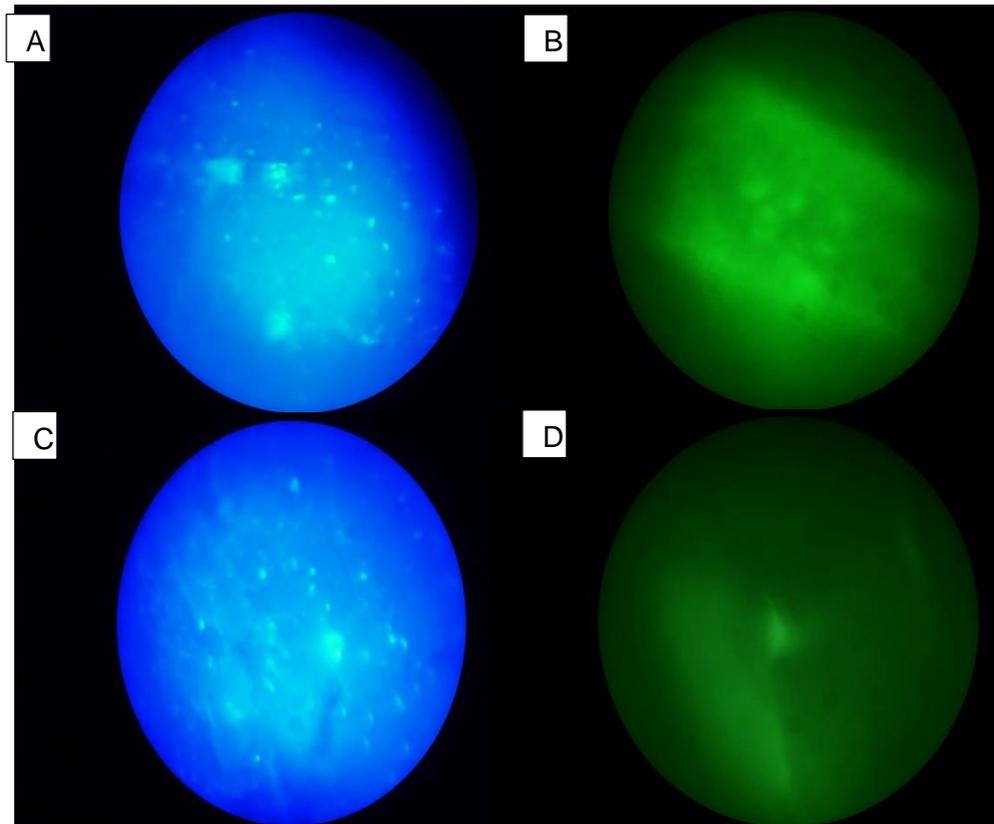


Figura 10. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **ATPasa**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con DAPI, B. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **ATPasa**. C. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **ATPasa**.

CATEPSINA K

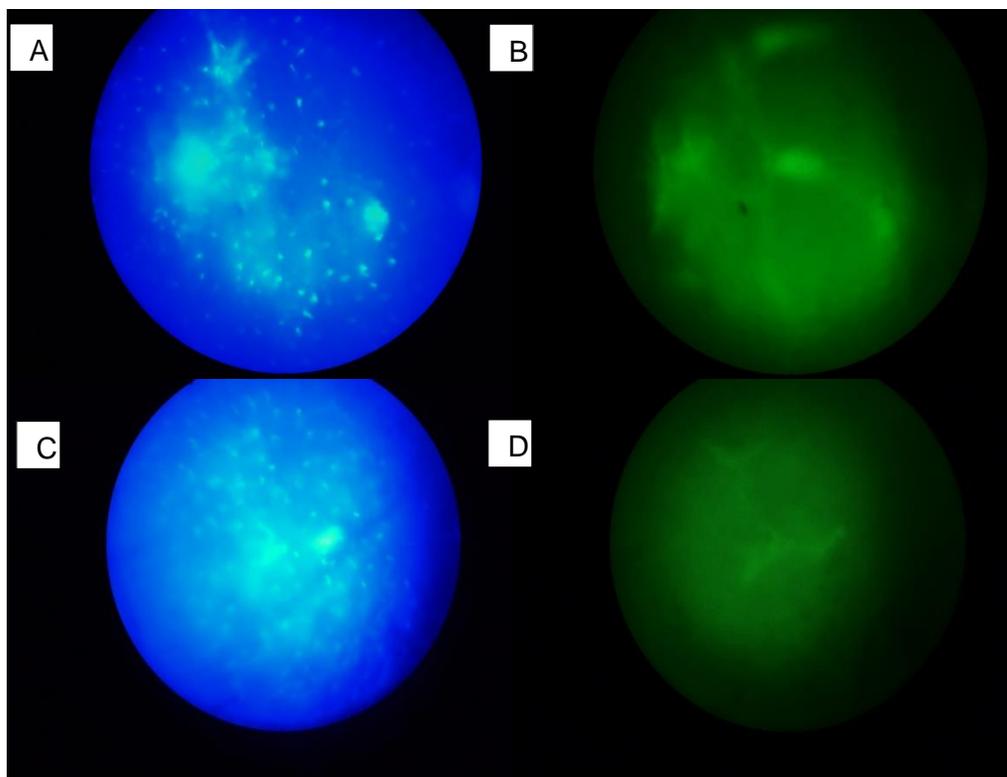


Figura 11. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **CATEPSINA K**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. PEG evaluando DAPI, B. PEG con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **CATEPSINA K**. C. PEG tratado con NAC, DAPI, y D. PEG tratado con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **CATEPSINA K**, obsérvese el contraste con imagen C, mostrando solo un grupo lineal positivo, obsérvese el contraste con imagen C.

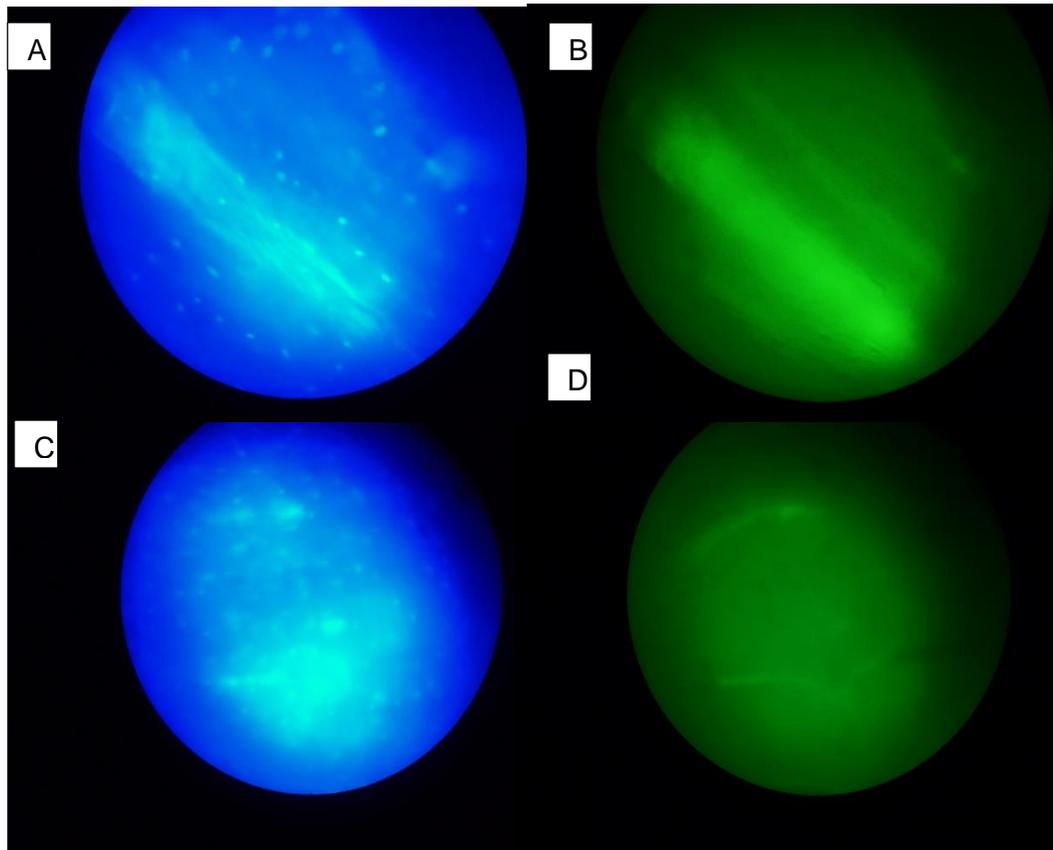


Figura 12 Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **CATEPSINA K**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células tratadas con fuerza con DAPI, B. células tratadas con fuerza con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **CATEPSINA K**. C. células tratadas con fuerza y con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **CATEPSINA K**. obsérvese el contraste con imagen C, mostrando prácticamente negativo el marcador.

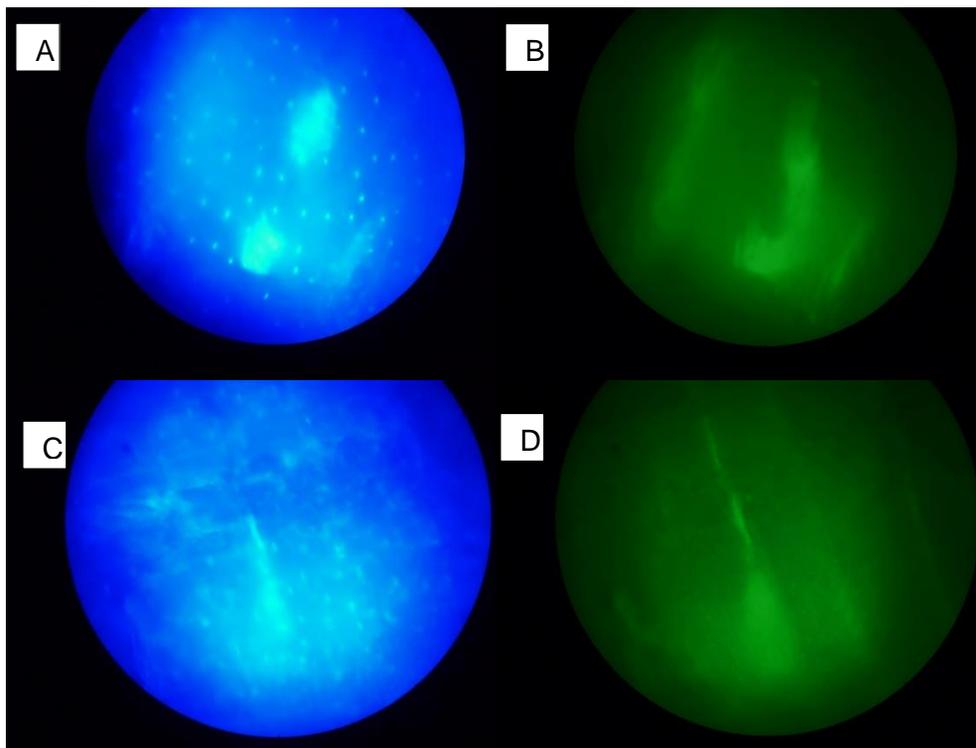


Figura 13. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **CATEPSINA K**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con DAPI, B. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **CATEPSINA K**. C. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **CATEPSINA K**.

DC STAMP

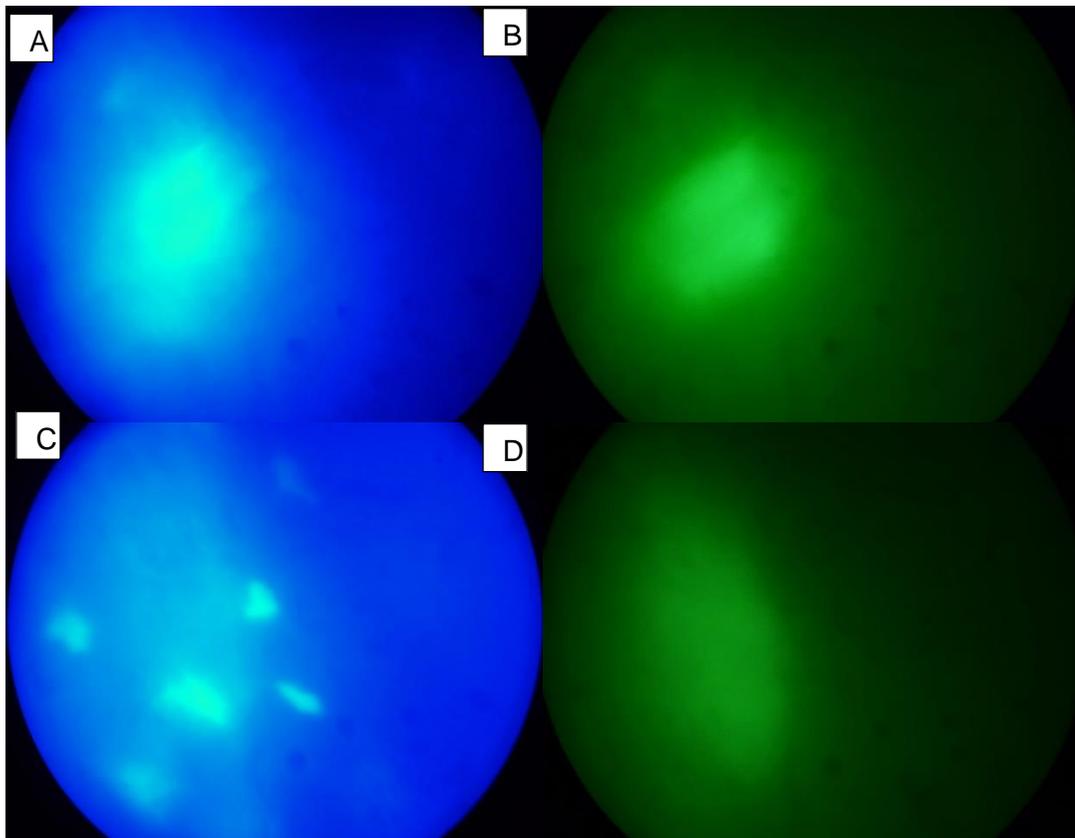


Figura 14. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **DC STAMP**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. PEG evaluando DAPI, B. PEG con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **DC STAMP**. C. PEG tratado con NAC, DAPI, y D. PEG tratado con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **DC STAMP**.

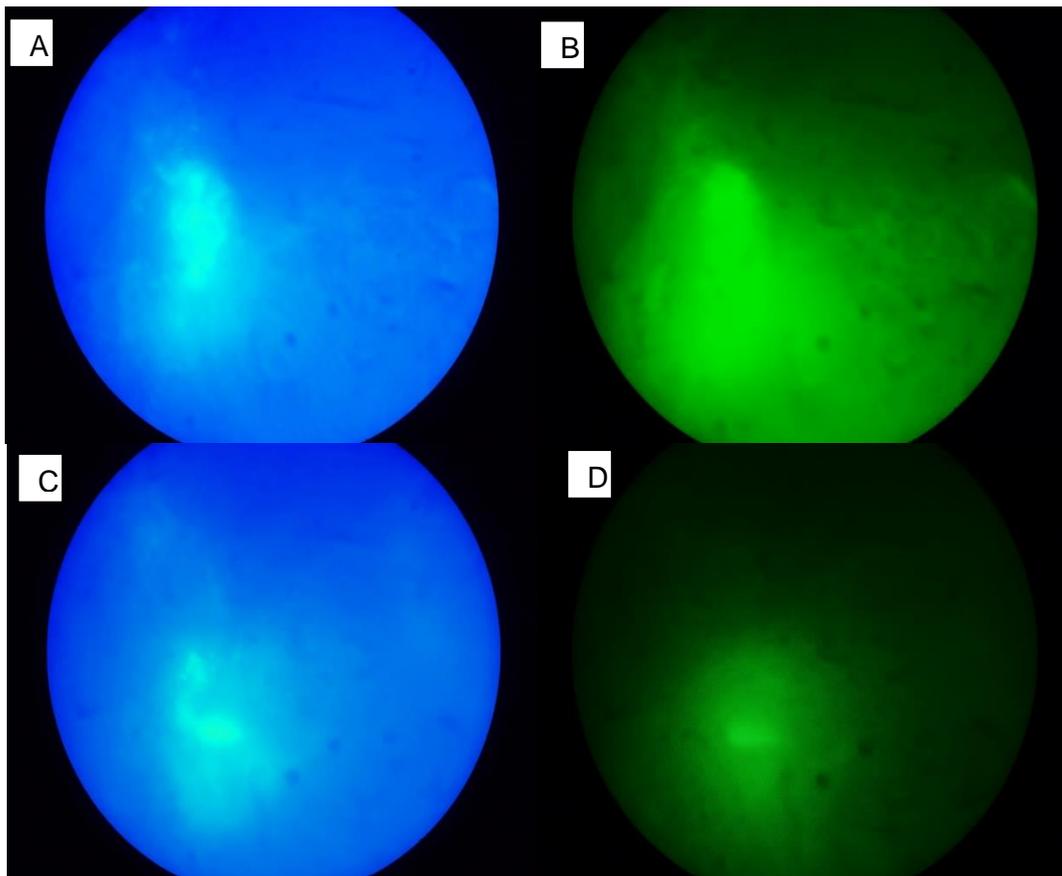


Figura 15. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **DC STAMP**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células tratadas con fuerza con DAPI, B. células tratadas con fuerza con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **DC STAMP**. C. células tratadas con fuerza y con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **DC STAMP**. obsérvese el contraste con imagen C, mostrando prácticamente negativo el marcador.

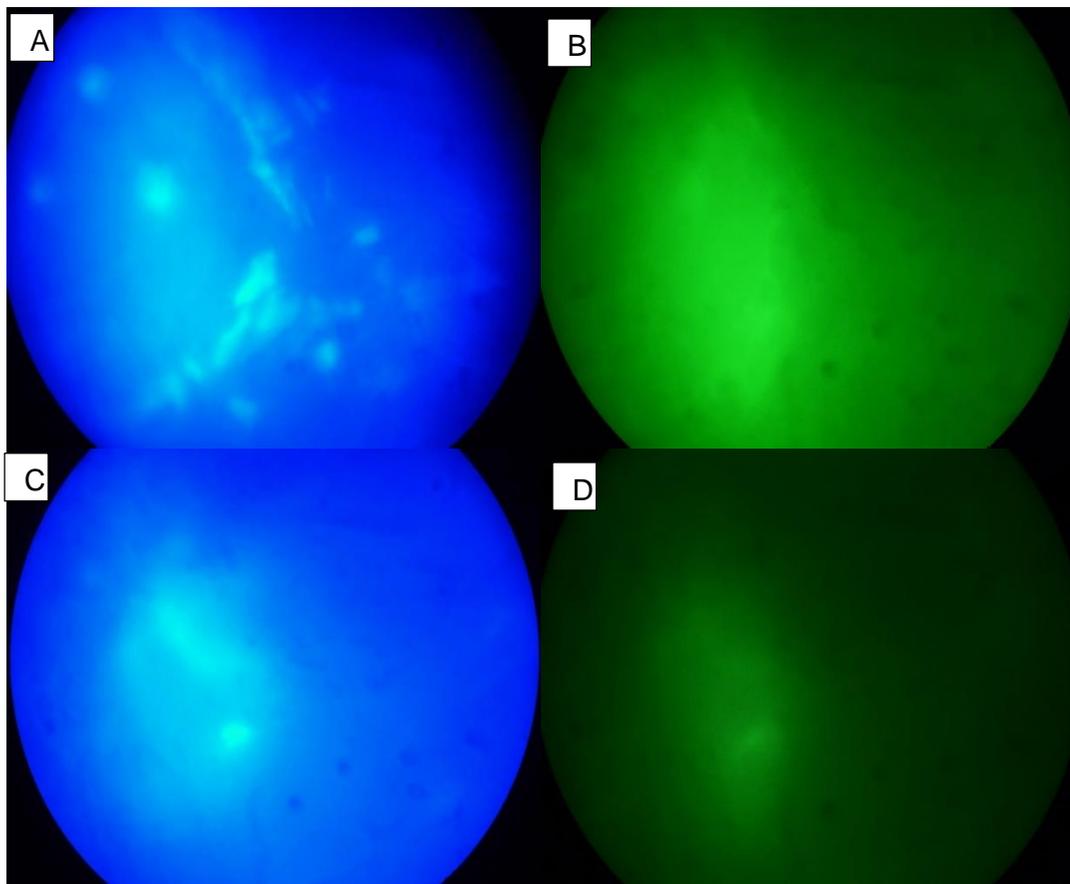


Figura 16. Figura 13. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **DC STAMP**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con DAPI, B. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **DC STAMP**. C. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **DC STAMP**.

INTEGRINA β 3

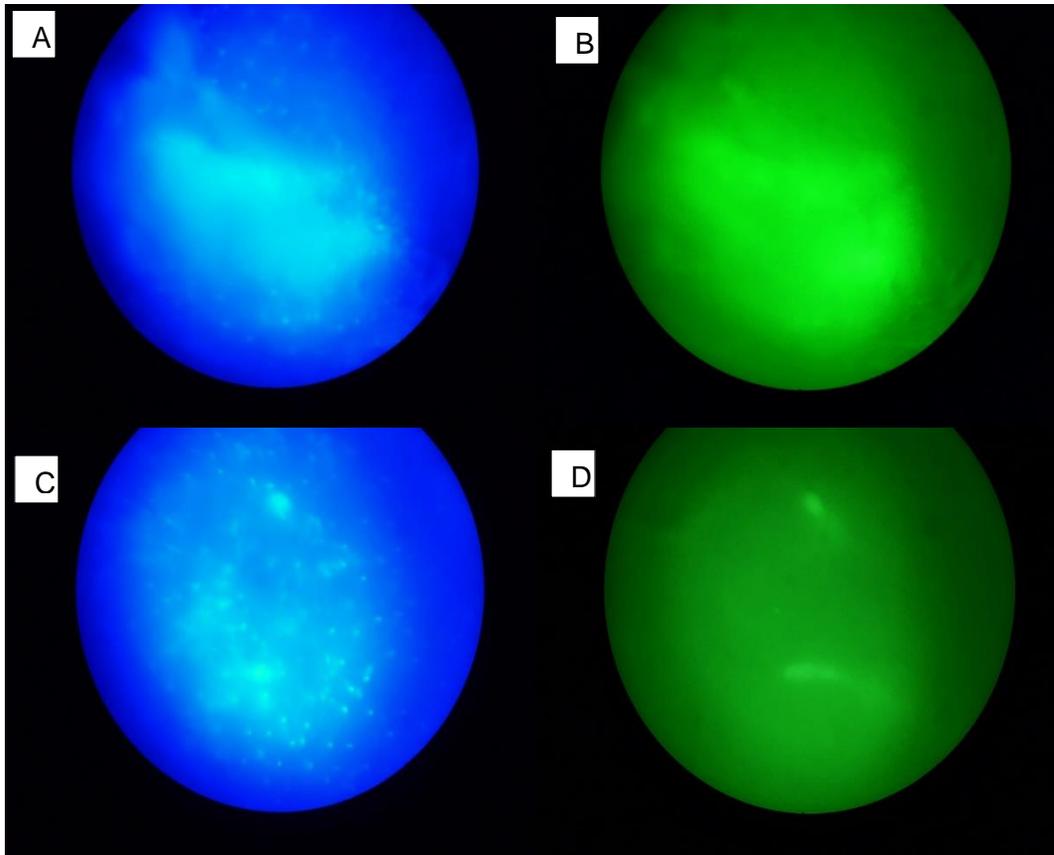


Figura 17. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **INTEGRINA β 3**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 μ g/ml DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. PEG evaluando DAPI, B. PEG con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **INTEGRINA β 3**. C. PEG tratado con NAC, DAPI, y D. PEG tratado con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **INTEGRINA β 3**, obsérvese el contraste con imagen C, mostrando solo 2 grupos positivos para el marcador.

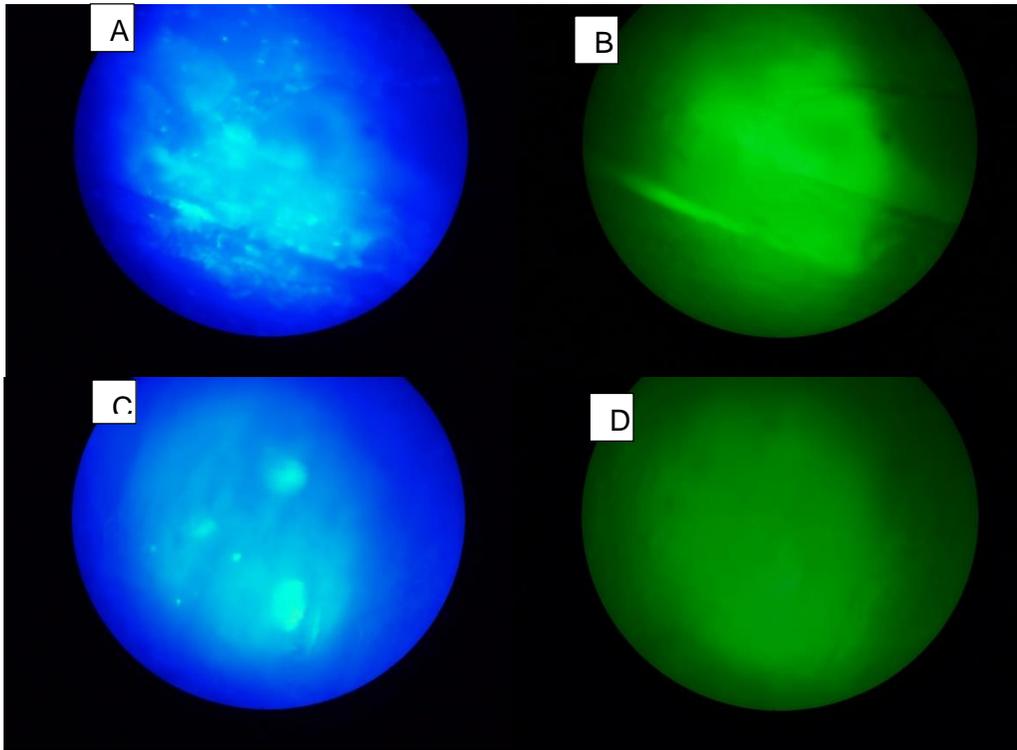


Figura 18. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **INTEGRINA β 3**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células tratadas con fuerza con DAPI, B. células tratadas con fuerza con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **INTEGRINA β 3**. C. células tratadas con fuerza y con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **INTEGRINA β 3**. Obsérvese el contraste con imagen C, mostrando prácticamente negativo el marcador.

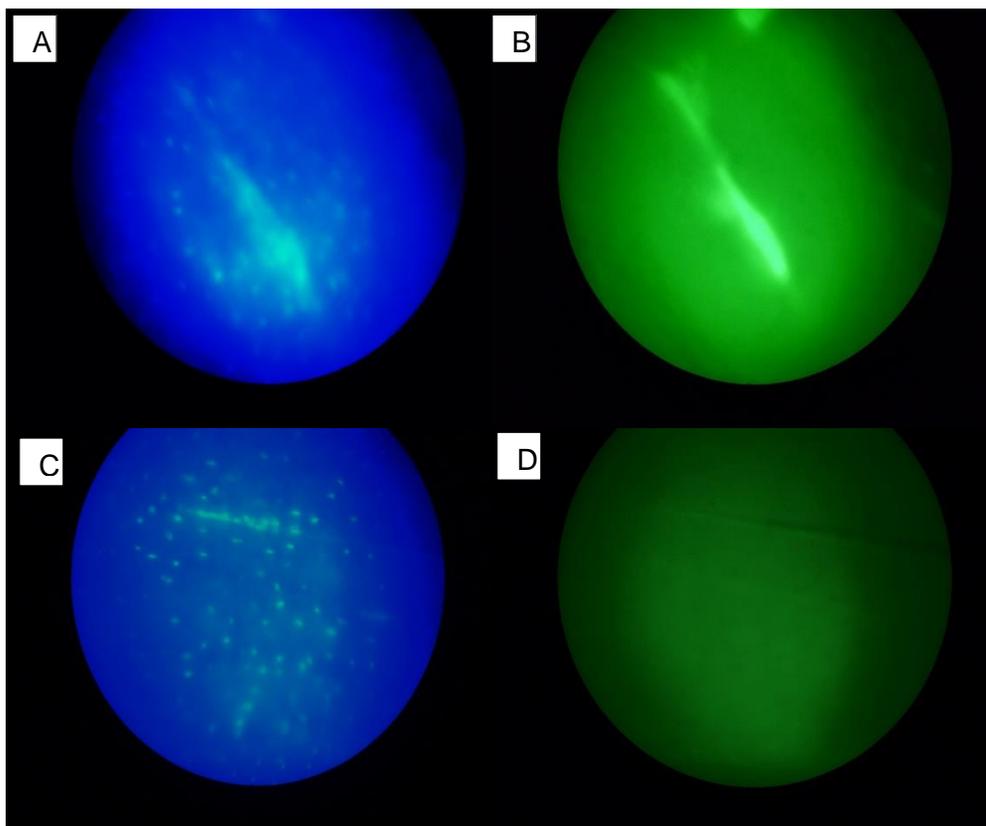


Figura 19. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **INTEGRINA β 3**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con DAPI, B. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **INTEGRINA β 3**. C. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **INTEGRINA β 3**.

RECEPTOR DE CALCITONINA

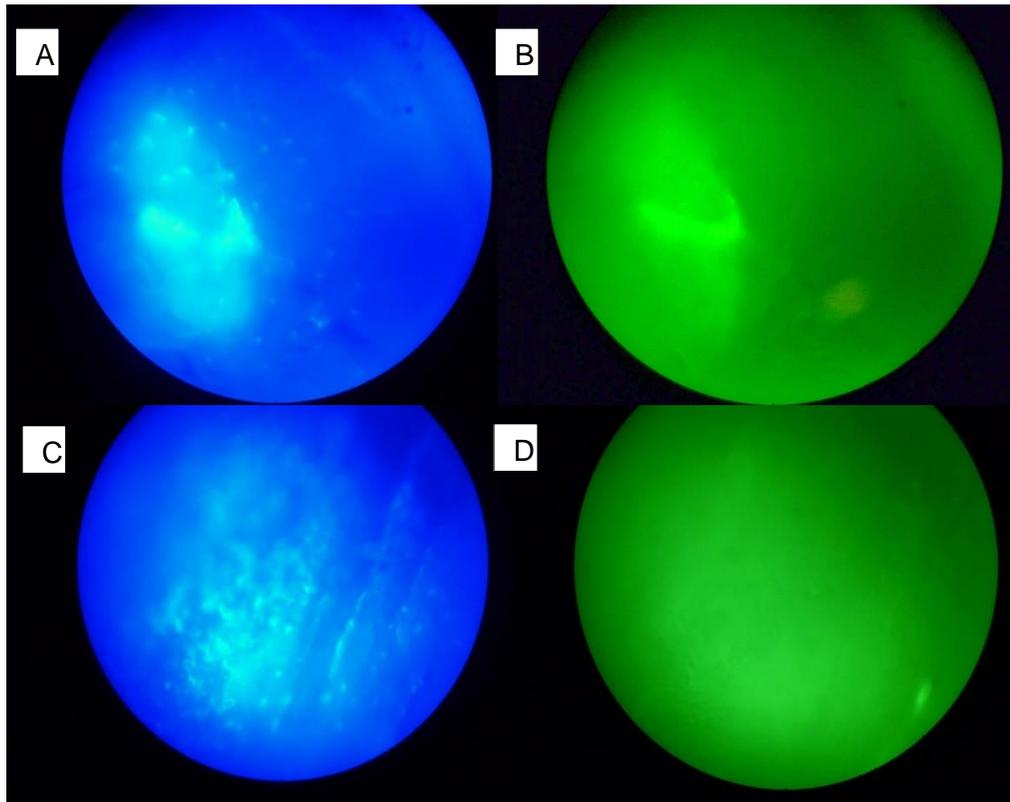


Figura 20. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **receptor de calcitonina**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 µg/ml DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. PEG evaluando DAPI, B. PEG con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **receptor de calcitonina**. C. PEG tratado con NAC, DAPI, y D. PEG tratado con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **receptor de calcitonina**, obsérvese el contraste con imagen C, mostrando prácticamente negativo el marcador.

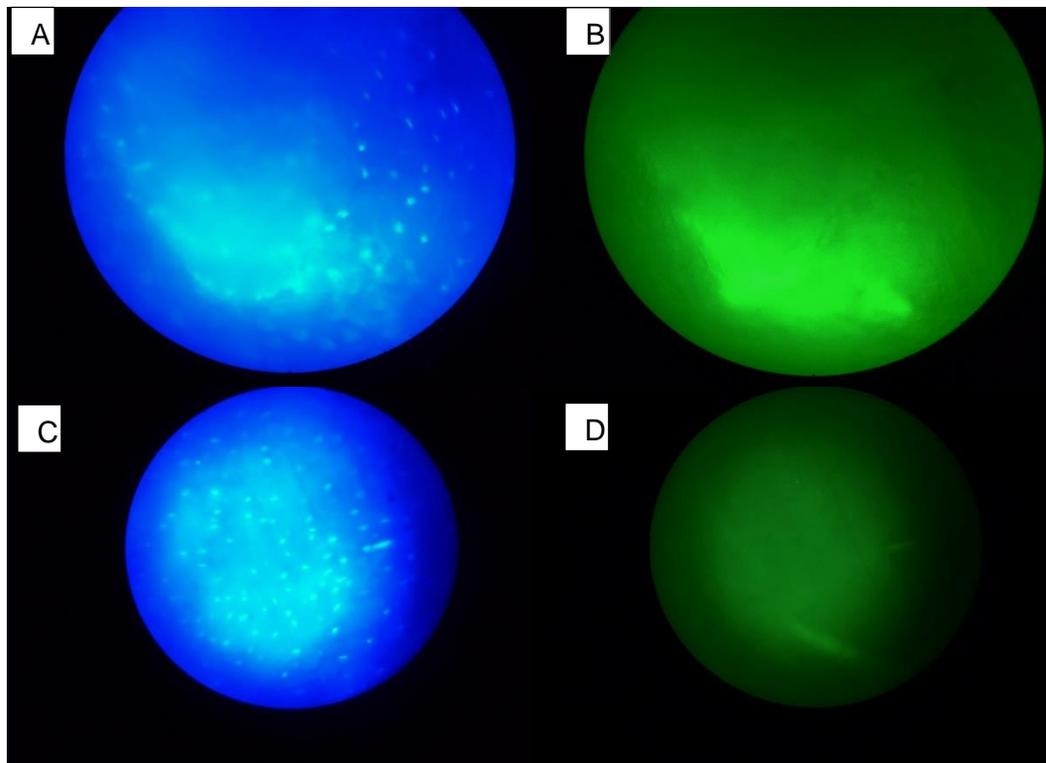


Figura 21. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **receptor de calcitonina**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células tratadas con fuerza con DAPI, B. células tratadas con fuerza con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **receptor de calcitonina**. C. células tratadas con fuerza y con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **receptor de calcitonina**. Obsérvese el contraste con imagen C, mostrando prácticamente negativo el marcador.

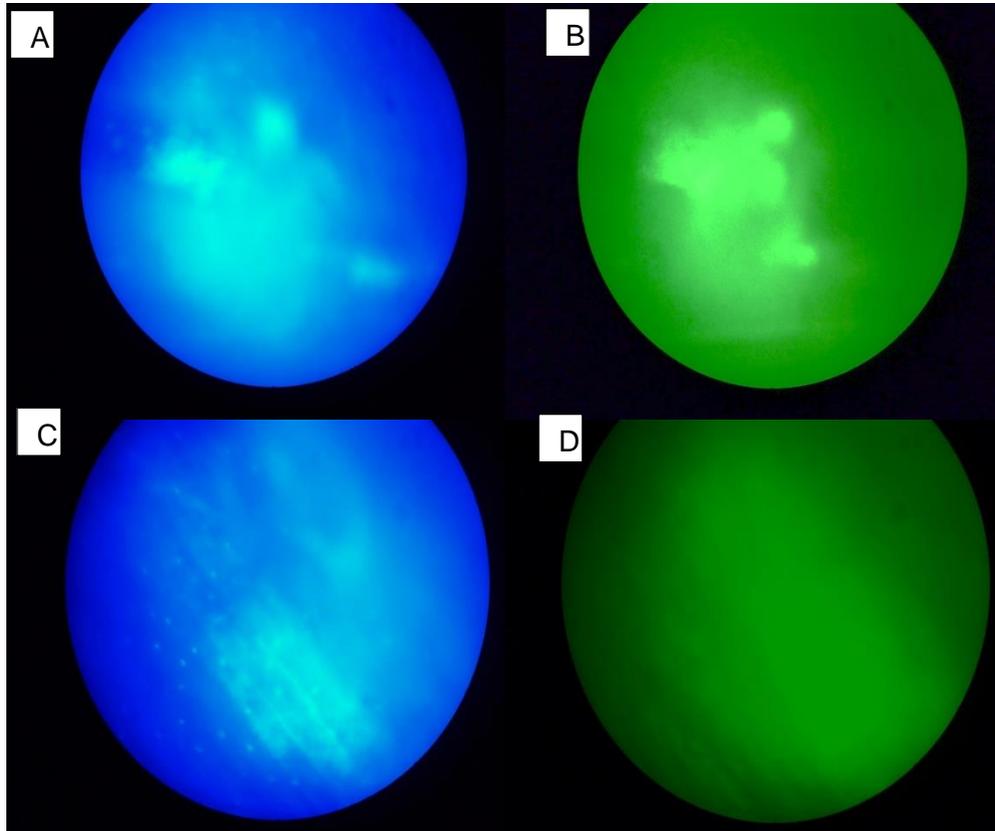


Figura 22. Microfotografías representativas de inmunofluorescencia del anticuerpo policlonal **receptor de calcitonina**, 5 días de cultivo. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) 100x. A. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con DAPI, B. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con fluorescencia para evidenciar positivo el marcador **receptor de calcitonina**. C. células no fusionadas no tratadas con fuerza (control) con NAC, DAPI, y D. células tratadas con fuerza y con NAC con fluorescencia para evidenciar el marcador **receptor de calcitonina**.

Microfotografías de la valoración de actividad resortiva en CMNSP fusionadas con PEG, sometidas a fuerza centrífuga y no fusionadas no sometidas a fuerza (control) y los mismos grupos tratados con NAC a los 5 días de cultivo sobre las láminas de hueso.

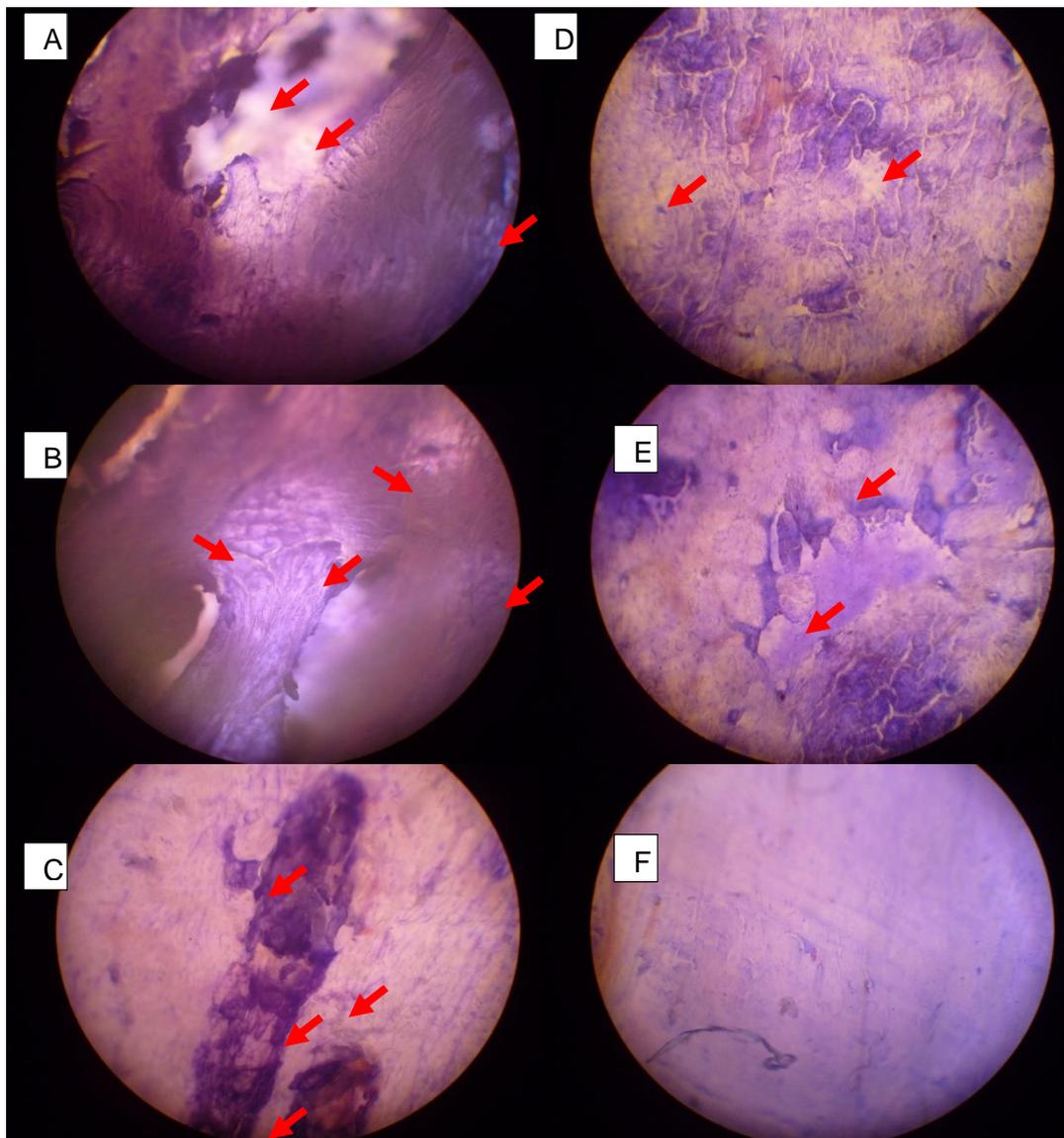


Figura 23. Microfotografías representativas de lagunas de resorción tinción Coomasie, a los 5 días de cultivo. Observadas a microscopio de luz (Vanguard®) objetivo de 10x, fotografías con cámara Panasonic® DMC-FHS, A, B y C fusionadas con PEG, y D, E y F fusionadas con PEG y tratadas con NAC.

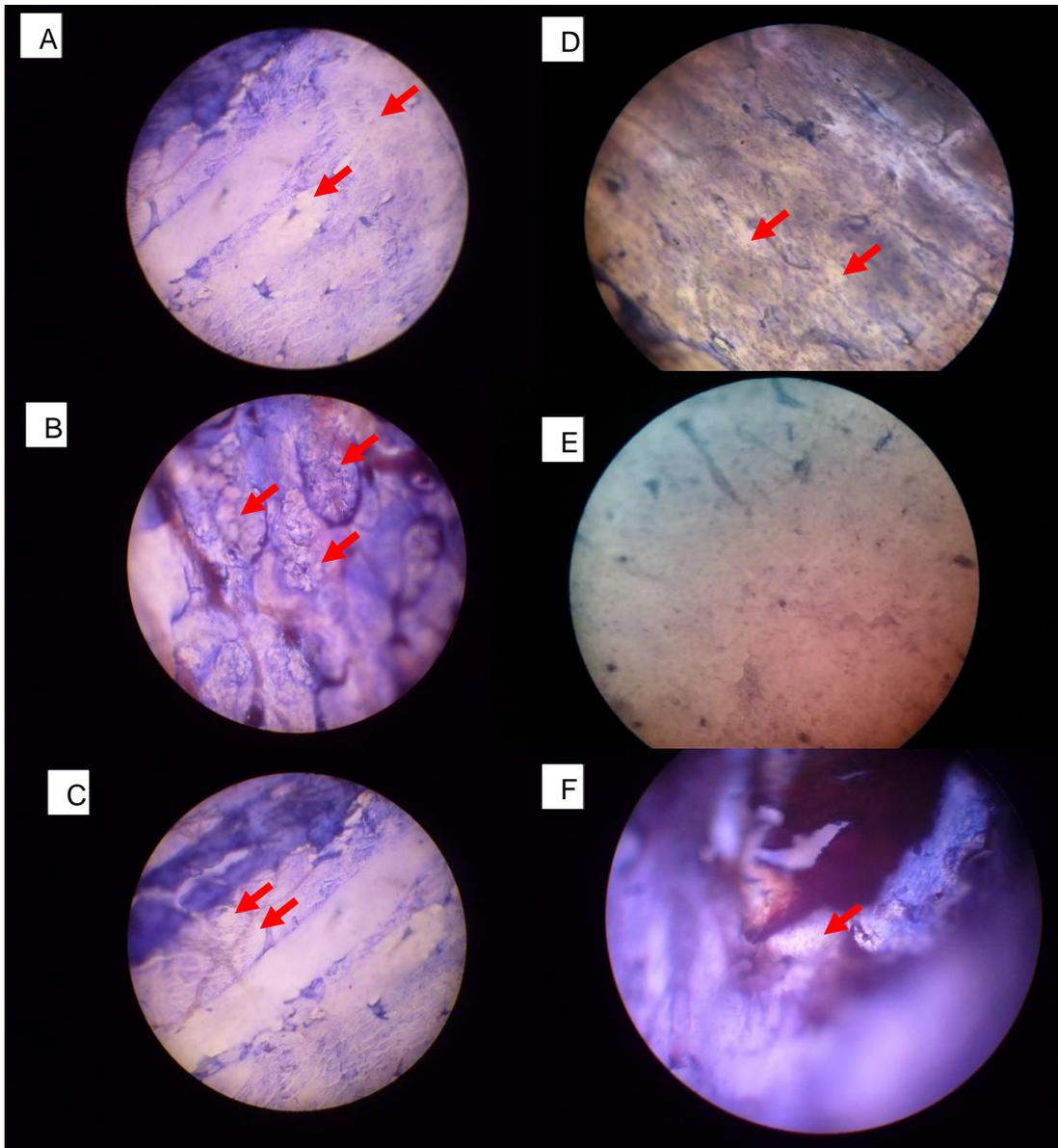


Figura 24. Microfotografías representativas de lagunas de resorción tinción Coomasie, a los 5 días de cultivo. Observadas a microscopio de luz (Vanguard®) objetivo de 10x, fotografías con cámara Panasonic® DMC-FHS, A, B y C tratadas con FUERZA, y D, E y F tratadas con FUERZA y NAC.

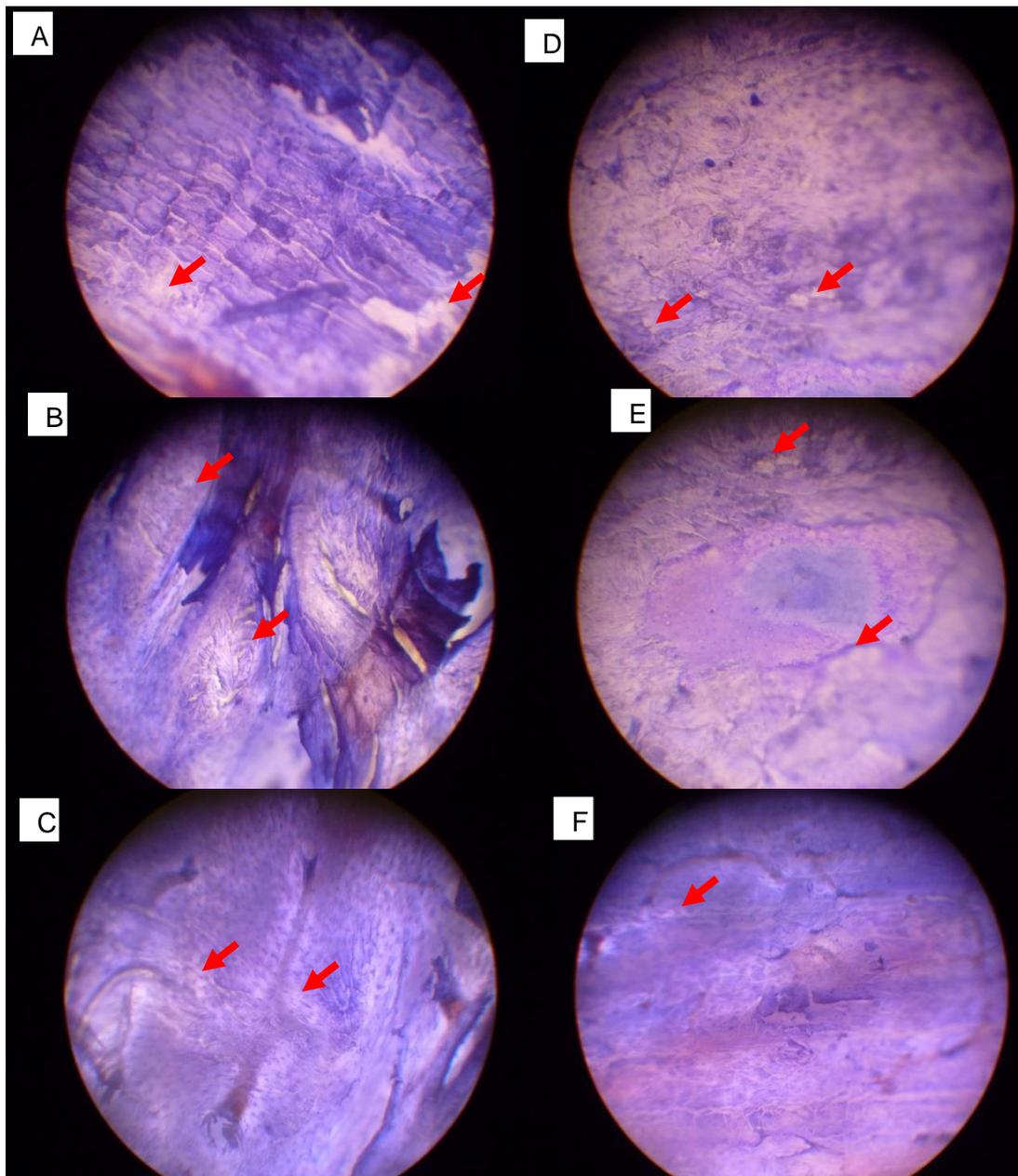


Figura 25. Microfotografías representativas de lagunas de resorción tinción Coomasie, a los 5 días de cultivo. Observadas a microscopio de luz (Vanguard®) objetivo de 10x, fotografías con cámara Panasonic® DMC-FHS, A, B y C no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL), y D, E y F no fusionadas no tratadas con fuerza (CONTROL) tratadas con NAC.

