



**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRAP Y RESORTIVA DE
CELULAS U937 LUEGO DE SOMETERLAS A FUERZA
CENTRIFUGA Y TRATARLAS CON AGENTES
OXIDANTES, ANTIOXIDANTES Y AGONISTAS DE PPAR-
gamma.**

Johana Andrea Reyes Parra

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento Fisiología
Bogotá, Colombia
2018

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRAP Y RESORTIVA DE
CELULAS U937 LUEGO DE SOMETERLAS A FUERZA
CENTRIFUGA Y TRATARLAS CON AGENTES
OXIDANTES, ANTIOXIDANTES Y AGONISTAS DE PPAR-
gamma.**

Johana Andrea Reyes Parra

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director (a):

MD. MSc. PhD. Carlos Arturo Guerrero Fonseca

Línea de Investigación:

Metabolismo óseo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento Fisiología
Bogotá, Colombia

2018

A mi familia; mi papá, mamá y hermanas, por apoyarme, encaminarme y ofrecerme siempre su amor y comprensión en todo lo que me he propuesto en la vida.

A mis amigos y compañeros que han estado dispuestos siempre a colaborarme y compartir su conocimiento conmigo.

A los docentes que me han guiado en este proceso y me han enseñado el significado de la ciencia.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y a mis docentes por darme la oportunidad de llevar a cabo mi proceso académico y por ser la guía para lograr culminar mis estudios de maestría.

A mi familia y amigos por darme el apoyo, amor, paciencia y comprensión en todo este proceso, y por ser siempre esa voz de aliento para seguir adelante a pesar de los problemas que se presentan.

Resumen

Los procesos de modelado y remodelado óseo están controlados por la actividad relativa de osteoblastos y osteoclastos; e influenciados por estímulos mecánicos, que inducen en el hueso la transformación de fuerzas físicas en señales bioquímicas que se transmiten entre las células que lo conforman. Adicionalmente, la actividad resorptiva es llevada a cabo por los osteoclastos que durante el proceso de diferenciación requieren una actividad bioquímica oxidativa y la represión de proteínas y genes implicados en la actividad reductora. Trabajos previos en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional, han observado que al someter las células a fuerzas centrífugas se observa actividad osteoclástica. Sin embargo, no se ha determinado si el estrés celular, por la fuerza centrífuga, origina una actividad oxidativa celular que induce a la actividad osteoclastogénica o si se induce actividad osteoclastogénica independiente del estrés oxidativo. Debido a ello, el objetivo de este estudio nos permite analizar los cambios característicos de actividad osteoclástica de células U937 sometidas a fuerza centrífuga y tratadas con agentes oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR γ .

Palabras clave: Osteoclasto, fuerza, estímulo mecánico, oxidantes, antioxidantes.

Abstract

The processes of modeling and bone remodeling are controlled by the relative activity of osteoblasts and osteoclasts; and influenced by mechanical stimuli, which induce in the bone the transformation of physical forces into biochemical signals that are transmitted between the cells that comprise it. Additionally, the resorptive activity is carried out by the osteoclasts that during the differentiation process require an oxidative biochemical activity and the repression of proteins and genes involved in the reducing activity. Previous work in the Laboratory of Molecular Biology of Viruses of the National University, has observed that when the cells are subjected to centrifugal forces, osteoclastic activity is observed. However, it has not been determined whether cellular stress, due to centrifugal force, causes cellular oxidative activity that induces osteoclastogenic activity or induces osteoclastogenic activity independent of oxidative stress. Due to this, the objective of this study allows us to analyze the characteristic changes of osteoclastic activity of U937 cells subjected to centrifugal force and treated with oxidizing agents, antioxidants and PPAR γ agonists.

Keywords: Osteoclast, strength, mechanical stimulation, oxidants, antioxidants.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas	XV
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
MARCO TEÓRICO	7
<i>Homeóstasis ósea.....</i>	<i>7</i>
<i>Diferenciación osteoclástica.....</i>	<i>9</i>
<i>Vía de señalización RANKL-RANK.....</i>	<i>9</i>
<i>Fusión del osteoclasto.....</i>	<i>11</i>
<i>Actividad osteoclástica.....</i>	<i>15</i>
<i>Marcadores del Osteoclasto.....</i>	<i>17</i>
<i>Especies reactivas de oxígeno en la osteoclastogénesis.....</i>	<i>19</i>
<i>Agentes oxidantes.....</i>	<i>20</i>
<i>Agentes Antioxidantes.....</i>	<i>22</i>
<i>Agonistas de PPAR gamma.....</i>	<i>24</i>
<i>Fuerzas en la actividad resortiva.....</i>	<i>24</i>
<i>Modelos in vitro de estudio de la aplicación de fuerza mecánica.....</i>	<i>25</i>
<i>Células óseas y estímulo mecánico.....</i>	<i>27</i>
<i>Antecedentes de estímulo mecánico en el osteoblasto y osteoclasto.....</i>	<i>35</i>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
LÁMINAS DE HUESO.....	37
CULTIVO DE CÉLULAS U937 EN LÁMINAS DE HUESO.....	37
APLICACIÓN FUERZA CENTRÍFUGA.....	38
EVALUACIÓN DE ROS.....	39
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE A TARTRATO (TRAP).....	40
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA.....	41

ANÁLISIS DE MARCADORES OSTEOCLÁSTICOS	42
INMUNOFLUORESCENCIA.....	42
ENSAYO DE VIABILIDAD	47
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
RESULTADOS.....	49
DISCUSIÓN	70
CONCLUSION.....	77
ANEXOS	79
BIBLIOGRAFÍA.....	97

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Diferenciación osteoclástica.	11
Figura 2: Resorción ósea por el osteoclasto.....	16
Figura 3: Osteocito, regulación de formación y resorción ósea.....	30
Figura 4: Vías de señalización osteocíticas.....	32
Figura 5: Vías de señalización activadas por el estímulo mecánico implicadas en la Osteoblastogénesis.....	33

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Magnitudes y frecuencias sobre osteoblasto y osteoclasto.....	36
Tabla 2: Tipos de fuerza ejercida, velocidad y revoluciones por minuto.....	39
Tabla 3: Lista de anticuerpos evaluados.....	43
Tabla 4: Caracterización de concentraciones de agentes oxidantes y antioxidantes en osteoclastos.....	46
Tabla 5: Porcentaje de intensidad de fluorescencia de marcadores osteoclasticos, de fusión (OC-STAMP, DC-STAMP, Sinc-1, CD-47 y ADAM-12) de actividad resorptiva (CTSK, MMP9, V-ATPSasa), y de diferenciación (NF-κB, NFATc1, PPAR gamma) de células U937 tratadas con fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} (30 r.p.m), durante 3 días de cultivo.....	65

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Significado

NF- κ B	<i>Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.</i>
NFATc1	<i>Factor nuclear de células T activadas, citoplasmático 1.</i>
ERVW-1	<i>Sincitina 1.</i>
CD47	<i>Proteína asociada a integrinas.</i>
DC STAMP	<i>Proteína transmembrana específica de células dendríticas.</i>
OC STAMP	<i>Proteína transmembrana estimuladora de osteoclastos.</i>
ADAM 12	<i>Proteína con dominios desintegrina y metaloproteinasas 12.</i>
CDH1	<i>Cadherina 1/ E-Cadherina.</i>
OPG	<i>Osteoprotegerina.</i>
TRAP	<i>Fosfatasa ácida tartrato resistente.</i>
CTSK	<i>Catepsina K.</i>
MMP9	<i>Metaloproteinasas 9.</i>
V-ATPase A1	<i>ATPasa vacuolar tipo H⁺.</i>
CA2	<i>Anhidrasa Carbónica II</i>
CD61	<i>Integrina Beta 3.</i>
VDAC1	<i>Canal selectivo de aniones voltaje dependiente 1.</i>
CT	<i>Receptor de calcitonina.</i>
NOX4	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4/ NADPH Oxidasa 4.</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno.</i>
RANK	<i>Receptor activador del factor nuclear kappa B.</i>
RANKL	<i>Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B.</i>
DMEM	<i>Medio de Eagle modificado por Dulbecco.</i>
SFB	<i>Suero fetal bovino.</i>
PBS	<i>Tampón fosfato salino.</i>
PEG	<i>Polietilenglicol.</i>
Mw	<i>Peso molecular.</i>
NAC	<i>N - Acetil Cisteína.</i>
PBMC	<i>Célula mononuclear de sangre periférica.</i>
BMMS	<i>Macrofagos derivados de médula ósea.</i>
PPAR γ	<i>Receptor del proliferador de peroxisoma gamma</i>
TZDs	<i>Tiazolidinedionas</i>
Ob	<i>Osteoblasto</i>
Oc	<i>Osteoclasto</i>
FGF	<i>Factor de crecimiento de fibroblastos</i>
TNF	

TGFb	<i>Factor de necrosis tumoral</i>
BMP	<i>Factor de crecimiento transformante beta</i>
Runx2	<i>Proteína morfogenética ósea</i>
DMNQ	<i>Factor de transcripción relacionado con Runt 2</i> <i>2,3-Dimetoxi-1,4-naftoquinona</i>

INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido complejo en el que la resorción y la formación continúan durante toda la vida por medio de un proceso llamado remodelación ósea. El tejido óseo contiene 2 tipos de células, de las cuales los osteoblastos formadores de hueso y los osteoclastos que resorben los huesos son los principales responsables de la homeostasis ósea ^{1,2,3}.

El osteoclasto, la célula encargada del proceso de resorción, es grande multinucleado y presenta diferentes características como la expresión de marcadores propios, como TRAP, CTSK, entre otros. Su origen no se ha descubierto plenamente, sin embargo, hay evidencias que sugieren que los osteoclastos provienen de la fusión de precursores mononucleares pertenecientes al linaje monocito-macrófago³⁻⁴.

El estudio y cultivo de los osteoclastos in vitro ha sido clave para que los científicos puedan investigar el metabolismo óseo y los mecanismos implicados en las enfermedades óseas, lo que permite encontrar un camino que admita desarrollar terapias que ayuden en el tratamiento de las mismas.

Los procesos de modelado y remodelado óseo están controlados por la actividad relativa de osteoblastos y osteoclastos; e influenciados por estímulos mecánicos, que inducen en el hueso la transformación de fuerzas físicas en señales bioquímicas que se transmiten entre las células que lo conforman⁵. Sin embargo, el conocimiento del efecto de la estimulación mecánica sobre las células óseas sigue siendo limitado.

Para investigar la influencia de los estímulos mecánicos en las células derivadas del hueso, se han establecido varios modelos *in vitro* con diferentes métodos, entre los cuales encontramos: deformación del sustrato o de la matriz donde crecen las células [Kaspar et al., 2000b; Schmidt et al., 2002; Ignatius et al., 2005], la aplicación de flujo de fluido a las células [You et al., 2001], vibración, oscilación, tensión por medio del sistema flexcell, modelos de compresión y tensión en 3D, aplicación de fuerza centrífuga, entre otros⁶. A pesar de tener estos modelos para el estudio *in vitro* de la estimulación mecánica sobre las células óseas, se desconoce en gran parte de qué manera la fuerza desencadena una respuesta y que tipo de respuesta genera sobre el osteoclasto o la actividad resortiva.

En el laboratorio de biología Molecular de virus de la Facultad de Medicina, bajo la dirección del profesor Carlos A Guerrero F, se ha estado estudiando el metabolismo óseo, utilizando un modelo que consiste en fusionar con polietilenglicol (PEG) células de la línea monocito/macrófago⁷, células polimorfonucleares de sangre periférica⁸, o células gingivales de cultivo primario⁹, observando que dichas células fusionadas adquieren características similares a osteoclastos, ya que expresan marcadores osteoclásticos como ATPasa vacuolar, anhidrasa carbónica, catepsina K, entre otros, además presentan actividad TRAP y resortiva ósea. Igualmente, trabajos previos en el mismo laboratorio han observado que al someter las células individuales fusionadas con PEG o no fusionadas, a fuerzas centrifugas, se observa actividad osteoclastica⁹⁻¹⁰. Este modelo ha sido importante para el estudio y generación de nuevas estrategias antiresortivas, ya que conocer los procesos de diferenciación de las células óseas se consideran un punto clave para tratar las patologías óseas.

Por otro lado, se conoce que para la proliferación y diferenciación de las células precursoras osteoclásticas es importante que exista un ambiente oxidante, lo que indica que las especies reactivas de oxígeno (ROS), tienen un papel importante en los procesos osteoclastogénicos y en la actividad resortiva^{11,12,13}.

Varios estudios in vitro han mostrado, que el aumento del estrés oxidativo induce la diferenciación osteoclástica; uno de ellos realizado por Hyeon y col, demostró en macrófagos derivados de médula ósea con el gen nulo para Nrf2, que al haber deficiencia de este factor de transcripción, responsable de regular la expresión de varias proteínas antioxidantes, hubo aumento de los niveles de ROS, lo que condujo a un aumento de la diferenciación de células osteoclásticas¹². Por otro lado, se demostró que la producción de superóxido es importante para promover la eficiente diferenciación del osteoclasto por medio de la inducción de NFATc1, un mediador corriente abajo de la osteoclastogénesis vía RANKL/RANK, ruta que media los procesos de fusión y diferenciación del osteoclasto¹⁴. Lo anterior sugiere que la producción o el aumento de ROS juega un papel importante en la inducción de la actividad resortiva o en el desarrollo de patologías que presentan pérdida ósea.

El receptor activado por el proliferador de peroxisoma PPAR γ , un factor de transcripción que actúa como un diferenciador celular, puede ser activado por diferentes ácidos grasos, como el ácido docosahexaenoico (DHA), entre otros, y se ha visto que existen varios reportes en donde este factor de transcripción, puede tener gran potencial antiresortivo¹⁵ o también puede inducir la resorción por medio de diferentes mecanismos¹⁶.

Adicionalmente, se sabe que algunos reactivos como las tiazolidinedionas (TZDs), medicamentos usados para tratar la diabetes tipo 2, tienen un rol en la osteoclastogénesis interfiriendo con la vía NF- κ B, actúan a través de la activación del receptor del proliferador de peroxisoma (PPAR γ), el cual se une al complejo p65 de NF- κ B lo que imposibilita su activación y posterior traslocación al núcleo¹⁷, paso importante para que se dé la osteoclastogénesis.

A pesar de todo lo que se conoce acerca de los factores que influyen en la osteoclastogénesis, no hay evidencia de investigaciones, en donde se aplique

estímulos mecánicos, junto con la adición de agentes oxidantes, antioxidantes, y agonistas de PPAR γ como las tiazolidinedionas. Debido a esto el propósito de este proyecto, es proponer este modelo como una herramienta para el estudio bioquímico y molecular de la resorción ósea y poder explicar cómo estos factores actúan en conjunto sobre el osteoclasto y su actividad resortiva.

JUSTIFICACIÓN

El hueso es un tejido especializado que tiene la habilidad de responder a estímulos mecánicos como la actividad física y el ejercicio. Este es capaz de reaccionar a las demandas mecánicas cambiantes, mediante la adaptación de su microestructura interna a través de las células encargadas de la formación y resorción ósea.

La actividad resortiva es llevada a cabo por células diferenciadas denominadas osteoclastos que durante el proceso de diferenciación requieren una actividad bioquímica oxidativa y la represión de proteínas y genes implicados en la actividad reductora. Trabajos previos en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Universidad Nacional, han observado que al someter las células a fuerzas centrífugas se observa actividad osteoclástica. Sin embargo, no se ha determinado si el estrés celular, por la fuerza centrífuga, origina una actividad oxidativa celular que induce a la actividad osteoclastogénica o si se induce actividad osteoclastogénica independiente del estrés oxidativo. Debido a ello, el objetivo de este estudio nos permite analizar los cambios característicos de actividad osteoclástica de células U937 sometidas a fuerza centrífuga y tratadas con agentes oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR γ . Esto nos ayuda a comprender si la actividad osteoclastogénica está relacionada con eventos bioquímicos generados por el estrés de la fuerza centrífuga o dicho estrés induce en la célula un estado oxidativo. Es decir, si obligatoriamente la célula genera actividad oxidativa, independientemente de la causa, como requisito para la actividad

osteoclastogénica y si dicha actividad se altera al tratar las células sometidas a la fuerza centrífuga, con agentes oxidantes, antioxidantes o agonistas de PPAR γ .

Con este trabajo exploramos la hipótesis de si la condición oxidativa o reductora de la célula altera la actividad osteoclástica. Puesto que no se utilizó hormonas relacionadas con la proliferación (M-CSF) o la diferenciación (RANKL) normalmente utilizadas para obtener osteoclastos, esto nos ayuda a saber si la función de RANKL durante la diferenciación es adecuar la maquinaria bioquímica para que la célula active vías pro-oxidantes y reducir las anti-oxidantes o reductoras, o si solamente es la de facilitar la fusión de membranas celulares y dicha fusión es la que desencadena los eventos bioquímicos pro-oxidantes. Todo esto nos ayuda a saber qué tan fuerte es el papel del estímulo mecánico en desencadenar los eventos bioquímicos implicados con la resorción a pesar que la célula se trate con agentes reductores u oxidantes.

OBJETIVO GENERAL

Determinación de marcadores característicos de actividad osteoclástica de células U937 sometidas a fuerzas centrífugas y tratadas con agentes oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR γ .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar actividad TRAP y resortiva en células sometidas a diferentes velocidades de fuerza centrífuga y tiempo de aplicación de la fuerza.
2. Determinar marcadores de fusión y actividad (OC-STAM, DC-DTAMP, CD-47, Sincitina-1, TRAP, CTSK, MMP9, V-ATPase, ADAM 12) de diferenciación (PPAR γ , NF- κ B, NFATc1) característicos de osteoclastos en células U937 sometidas a fuerza centrífuga.

3. Analizar la actividad TRAP y resortiva en células tratadas con agentes oxidantes (DMNQ y DL Homocisteina, Peróxido de hidrógeno), antioxidantes (NAC, ácido ascórbico, trolox y tempol) y agonistas de PPARg (Tiazolidionas, DHA, retinol), sometidas a fuerza centrífuga

MARCO TEÓRICO

El hueso es un tejido dinámico¹ y especializado que facilita el movimiento y resiste la gravedad². Además, es un tejido activo que es mantenido por células óseas tales como osteoblastos que forman hueso y osteoclastos que lo resorven³. Por lo tanto, el equilibrio entre la formación ósea osteoblástica y la resorción ósea osteoclástica es importante para la homeostasis ósea normal⁴.

Homeóstasis ósea.

El tejido óseo presenta adaptación continua durante la vida de los vertebrados preservando la estructura, talla y forma, para de esta manera regular la homeostasis mineral^{18,19,20}. Los procesos que ayudan al desarrollo y mantenimiento del esqueleto son la remodelación y la modelación ósea²⁰.

El modelado óseo es el proceso que define el desarrollo y crecimiento esquelético, éste es responsable de la adaptación mecánica del hueso y requiere de la formación ósea y resorción de manera independiente^{20,21,22}.

Por otro lado, el remodelado óseo es responsable de la remoción y reparación del daño óseo, y tiene como objetivo mantener la integridad del esqueleto adulto; éste es un proceso donde los osteoclastos y los osteoblastos trabajan de manera secuencial en la misma unidad de remodelación ósea^{20,21,22}.

La actividad resortiva tarda aproximadamente 3 semanas y el proceso de formación de 3 a 4 meses. La remodelación consta de 5 etapas: activación, resorción, inversión, formación y terminación; y este proceso es mediado por las células

óseas: osteoblastos, osteoclastos y osteocitos (encargados de la mineralización del hueso)²⁰.

Los *osteoblastos (Ob)*, son células derivadas de una célula madre mesenquimal, encargadas de la formación ósea, éstas se diferencian por medio de diversas vías de señalización, dentro de las cuales las más importantes son: la vía Wnt B-catenina, BMPs, FGF y TGF beta ^{23,24,25,26}; éstas vías conducen a la activación y translocación al núcleo de los factores de transcripción osteogénicos fundamentales, Osterix y Runx2, los cuales comienzan la transcripción de genes importantes para la proliferación, diferenciación y maduración del osteoblasto²⁹.

El *osteoclasto (Oc)*, es una célula que se diferencia a partir de una célula madre hematopoyética, proviene del linaje monocito/macrófago, son células multinucleadas que se originan a partir de un proceso de fusión, y son capaces de realizar la actividad resorptiva del hueso. La vía de señalización más importante para la proliferación y supervivencia del OC es la del Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y la segunda más importante para el proceso de diferenciación y fusión, es la del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) una citoquina liberada en su gran mayoría por el osteoblasto; la activación de esta vía de señalización da como resultado una serie de señales intracelulares que conducen a la activación y translocación al núcleo de factores de transcripción osteoclastogénicos como TRAP, Cathepsina K, MMP-9, DC-STAMP, entre otros^{27,28,29}.

Por otro lado hay otras células involucradas en estos procesos, entre las cuales encontramos las del sistema inmune, como las células T y B, que facilitan el reconocimiento y destrucción de patógenos, al igual que participan por medio de la liberación de citoquinas que a su vez tienen un papel en la diferenciación osteoclástica^{30,31,32}. Una evidencia de esto es el estudio realizado por Li y colaboradores en el año 2007, en donde observaron que ratones que presentan carencia de linfocitos T y B dieron como resultado huesos osteoporóticos²³.

Adicionalmente, observaron que las células B son responsables de la liberación de OPG (osteoprotegerina), un ligando que inhibe la vía de señalización RANKL-RANK, vía osteoclastogénica, y que además las células T a través del ligando CD40L, actúan promoviendo la producción de OPG por las células B, uniéndose a su receptor CD40 en las mismas. Consecuentemente el Knockout (KO) de CD40 realizado en ratones, arrojó ratones con osteoporosis y disminución en la producción de OPG, sugiriendo que éstas células participan en el mantenimiento de la homeóstasis ósea²⁰⁻³⁰.

Diferenciación osteoclástica.

Los osteoclastos son células multinucleadas formadas por fusión citoplásmica de sus precursores mononucleares; están en el linaje mieloide de células hematopoyéticas que también dan lugar a los macrófagos²⁹⁻³³⁻³⁴. Se han reportado etapas de diferenciación osteoclástica, que son: diferenciación temprana, donde la célula madre hematopoyética prolifera, una etapa de diferenciación media, donde se expresan marcadores osteoclastogénicos como TRAP, entre otros, y la etapa final, en donde se realiza el proceso de fusión. En la literatura se ha reportado que el cambio a la diferenciación de osteoclastos requiere de la expresión en los precursores osteoclasticos (Pre-OCs) de c-Fos, NFATc1 y AP.1, factores de transcripción activados por la vía de RANKL³³⁻³⁴.

Vía de señalización RANKL-RANK.

RANKL es identificado como un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral, se ha visto que influencia varios procesos biológicos como la homeostasis, funciones del sistema inmune, entre otros^{33,34}.

La expresión de RANKL se produce en las células osteoblásticas y se sabe que tiene un papel fundamental en la estimulación de la formación y la actividad de los

osteoclastos. Está altamente expresado en los ganglios linfáticos, timo y pulmón, y bajamente expresado en una variedad de tejidos, incluyendo el bazo y la médula ósea³⁴.

La vía de señalización RANKL-RANK se desencadena una vez el RANKL se une a su receptor RANK el cual es expresado por los progenitores mieloides en la superficie celular; esta unión induce la activación, ubiquitinación, unión y degradación lisosomal de proteínas TRAF al receptor, éstas son proteínas transmembrana que al igual que los receptores de TNF, no tienen capacidad intrínseca para activar las proteínas quinasas y así mediar en la señalización. TRAF 2, 5, y 6 se unen a RANK, pero de estos sólo TRAF3 y 6 parecen ser esencial en los osteoclastos, lo que se ha visto en diversos estudios, que cuando se realizó KO de TRAF6 en ratones, se observó osteopetrosis^{34,38}. Seguido de esto, se comienza la activación de vías de señalización intracelulares que incluyen NF- κ B y MAPK, lo que da como resultado final la activación de factores como c-Fos y NFATc1 que junto con AP.1 median la transcripción de genes osteoclastogénicos como: TRAP, Catepsina K, MMP9, V-ATPasa, entre otros^{35,36,37}.

Lo anterior sucede con el fin de activar MAPKs como JNK, ERK y p38, y por otro lado el complejo I κ B, las cuales inducen la fosforilación de I κ B- α que libera los heterodímeros p65-p50 los cuales se translocan al núcleo. Esto desencadena la activación de c-Fos y NFATc1 que junto con AP-1 median la expresión de genes osteoclastogénicos³⁴⁻³⁸.

A pesar de que la vía de RANKL es la más estudiada y la más importante en los procesos de diferenciación osteoclástica, no es la única; existen otras vías implicadas en el proceso, como por ejemplo la vía de M-CSF, TNF-alfa, OSCAR, entre otras, que influyen en los procesos osteoclasticos y dan como resultado la expresión de genes implicados en diferenciación, fusión y actividad osteoclástica³⁷⁻

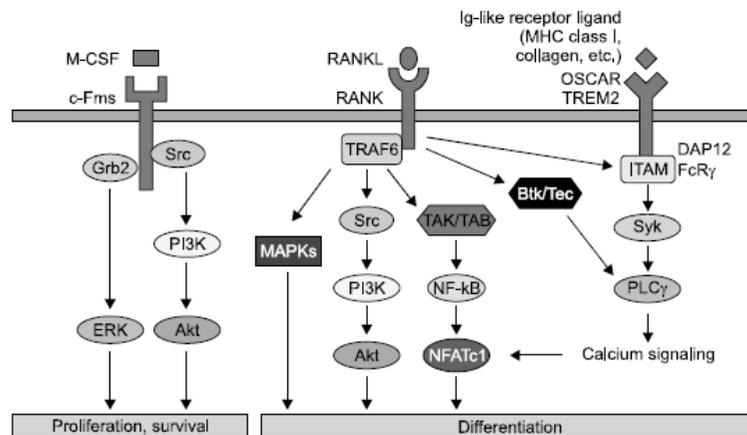


Figura 1. Diferenciación osteoclástica Fuente: Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. Chonnam Med J. 2016.

Ahora bien, para que no se estimule todo el tiempo los procesos de resorción, es necesario regular la activación de la vía RANKL-RANK, proceso realizado por la osteoprotegerina (OPG), un miembro de la superfamilia de receptores del TNF segregado por los osteoblastos no anclados a la membrana, que actúa como un inhibidor competitivo que inhibe su unión al receptor RANK, impidiendo así la osteoclastogénesis³⁴⁻⁴⁰. En estudios previos, se ha demostrado que la OPG, aparte de impedir la diferenciación del osteoclasto, también induce apoptosis de los mismos por medio de la vía de señalización Fas/FasL⁴¹.

Fusión del osteoclasto

La fusión celular es un proceso importante en el cual las células mononucleares se unen para formar células multinucleares. Este proceso ocurre durante la diferenciación de las células, y es necesario para que la célula madure, pueda estar activa y realizar su función⁴².

Los procesos de fusión osteoclástica son poco conocidos, pero es importante estudiarlos ya que esta es una característica de los osteoclastos maduros, la cual se requiere para que puedan estar activos y realizar la resorción ósea⁴³.

La fusión celular puede ocurrir entre dos células mononucleares, o entre una célula mononuclear y otra multinuclear, además es un proceso mediado por la estructura de actina de cada célula que se conecta antes y durante la fusión membranar^{42,43}.

Los osteoclastos necesitan para realizar su actividad resortiva una zona de sellado, la cual está compuesta por una superestructura de actina, un componente fundamental del citoesqueleto de las células; los osteoclastos primero desarrollan un grupo de podosomas, que luego crecen en una pequeña estructura anular, el anillo de los podosomas. Un osteoclasto a menudo tiene varios anillos de podosomas, que a su vez se desarrollan en un gran anillo que corre a lo largo de la periferia de la célula, conocido como el cinturón de los podosomas, que se transforma en el sitio de contacto entre dos osteoclastos, y permite su unión e interacción^{42,43,44}.

Este proceso de fusión es mediado por proteínas de membrana que estimulan y ayudan a la unión de los pre-OCs, dentro de las cuales las más estudiadas e importantes son: DC-STAMP, OC-STAMP, ADAM-12, CD47, Sincitina 1, entre otras.

A continuación se hará una breve descripción los marcadores de fusión mencionados anteriormente:

DC-STAMP.

La proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) se considera actualmente el regulador maestro de la fusión osteoclástica. Es una proteína de 470 aminoácidos, tiene siete regiones transmembranales, tres sitios

potenciales de glicosilación unidos a N, un sitio de fosforilación de proteína quinasa C y una cola citoplásmica de 72 restos que contiene múltiples serinas, dos de los cuales son probablemente los objetivos de la fosforilación^{45,46,47}.

Estudios previos en donde ha realizado Knock out del gen DC-STAMP, se observa la anulación completa de la fusión célula-célula durante la osteoclastogénesis^{45,46}. Osteoclastos aislados a partir de ratones con Knock out (KO) de DC-STAMP son osteoclastos mononucleares debido a la deficiencia en la fusión mostrando osteopetrosis leve o un proceso de resorción ósea poco invasivo^{45,46,48}.

La expresión de DC-STAMP se regula por medio de 2 factores, C-Fos y NFATc1, los cuales son esenciales para la diferenciación de osteoclastos y también según estudios previos son necesarios para la expresión de DC-STAMP y la fusión célula-célula en osteoclastos⁴⁹.

OC-STAMP.

Conocida como proteína transmembranal estimuladora del osteoclasto, es similar en función a la proteína DC-STAMP, y se ha demostrado que es necesaria para la fusión de pre-osteoclastos y para la actividad óptima de resorción ósea⁵⁰.

En un estudio se usaron células madre embriológicas de ratón portadoras de un alelo mutado para generar una segunda cepa de ratón OC-STAMP nula. La histología ósea mostró tejido óseo normal en general con gran número de osteoclastos mononucleares TRAP-positivos, al igual que una inhibición completa de la fusión célula-célula y un número nulo de osteoclastos multinucleados⁵⁰⁻⁵¹.

CD-47 y Sincitina-1.

CD-47 es una glicoproteína transmembrana, que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas. Se ha demostrado que los macrófagos expresan la forma hematopoyética de CD47, cuya expresión se induce en el inicio de la fusión⁴⁶. CD-47 se une a su receptor MFR, lo que conduce al reconocimiento célula a célula y de ésta manera media los procesos de fusión osteoclástica. En un estudio en donde se usaron 9 anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de CD47, 3 bloquearon la fusión cuando estaban en presencia del receptor de fusión de macrófagos, sugiriendo que tanto CD47 junto con los receptores de fusión de los macrófagos están implicados en los procesos de multinucleación de los macrófagos⁵².

Se ha sugerido que la sincitina-1 es una proteína codificada por un gen endógeno humano que se integró de forma estable en el genoma del antepasado humano hace más de 24 millones de años. Tras su activación, la sincitina-1 es capaz de desestabilizar la bicapa lipídica de la célula diana y forzar la fusión de las membranas plasmáticas⁵³.

Estudios previos analizaron eventos de fusión individuales usando lapso de tiempo y antagonistas de CD47 y sincitina-1; demostrando que CD47 y sincitina-1 tienen diferentes funciones en la fusión. CD47 promueve fusiones celulares que implican pre-osteoclastos mono-nucleados, mientras sincitina-1 promueve la fusión de dos osteoclastos multi-nucleados, pero también reduce el número de fusiones entre pre-osteoclastos mono-nucleados. Además, CD47 parece mediar la fusión sobre todo a través de amplias superficies de contacto entre la membrana celular de las células fusionadas mientras que la sincitina-1 media la fusión a través de la estructura de la copa fagocítica⁵⁴.

En este mismo estudio se planteó que la proteína CD-47 se encuentra en su gran mayoría cuando las células se encuentran mononucleares, es decir previo a la fusión como tal, siendo importantes para mediar señales que inicien la fusión, y la

proteína Sincitina-1 se encuentra en las células ya fusionadas probablemente actuando en etapas tardías de fusión celular⁵⁴.

ADAM-12.

Los ADAM son proteínas de metaloproteasa-desintegrina que han estado implicadas en la adhesión celular, el desprendimiento de ectodominio de proteínas, la degradación de proteínas de la matriz y la fusión celular⁵⁵. Varios estudios han informado que la proteína ADAM12, es un importante regulador de la diferenciación osteoclástica⁵⁶.

En algunos estudios se ha analizado el rol de ADAM 12 sobre la formación de células multinucleares, en el estudio de Ma y colaboradores, se realizó una hibridación in situ, tinción inmunohistoquímica y un western blot de las células que se encontraban alrededor de una zona de implantes, y encontraron que las células mononucleares que contenían mRNA de ADAM 12 se observaban en menor cantidad comparado con células multinucleares positivas a ADAM 12, también observaron que el 52% de las células de la superficie fueron ADAM-12 positivas comparado con el control 5%, además de esas células ADAM12 positivas la mayoría formaron células bi y multinucleadas. Todo esto indica que ADAM-12 está implicado en los procesos de fusión célula a célula y que ayudan en la formación de células multinucleadas y osteoclastos⁵⁷.

Actividad osteoclástica

El osteoclasto es la célula encargada de realizar la función resortiva del hueso. Este proceso se da en el sitio de contacto entre el osteoclasto y el hueso, llamado zona de sellado, en donde el osteoclasto forma anillos de f-actina y una zona de sellado entre el hueso y la propia célula, proceso mediado por la integrina alfa v beta3 o también conocida como receptor de vitronectina (VNR)⁵⁸.

El hueso tiene 2 componentes principales: el orgánico y el inorgánico, que su vez están conformados en su gran mayoría por colágeno tipo I e hidroxapatita

respectivamente⁵⁹. La resorción ósea envuelve la disolución de los cristales de hidroxiapatita seguido de la escisión proteolítica del componente inorgánico⁵⁹⁻⁶⁰.

El proceso de resorción se da en la zona de sellado, donde los osteoclastos forman una membrana celular especializada conocida como el borde en cepillo, que facilita la función resortiva de la célula ya que permite la secreción de protones y proteasas que desmineralizan la matriz ósea⁶¹. Una vez el osteoclasto se une al hueso, actúan enzimas como la anhidrasa carbónica, que tiene como función acidificar el microambiente de resorción para disolver el mineral óseo. Seguido a esto, las enzimas lisosomales como la catepsina K, TRAP, MMP9, entre otras son liberadas para degradar la matriz ósea; y por último los productos de degradación son endocitados por los osteoclastos y liberados dentro de un fluido extracelular^{58,60,61}.

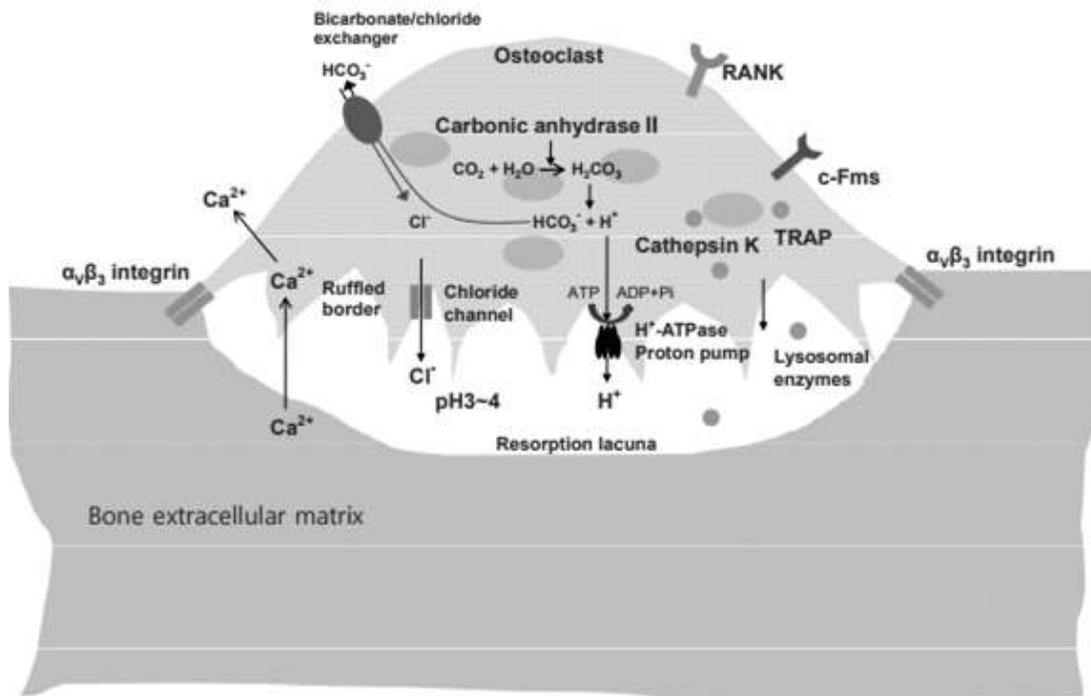


Figura 2. Resorción ósea por el osteoclasto. Fuente: Na Kyung Lee. Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology. 2010.

Marcadores del Osteoclasto.**TRAP.**

La fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP), es una enzima considerada como un marcador histoquímico de los osteoclastos. TRAP se expresa por osteoclastos, macrófagos, células dendríticas y un número de otros tipos de células. Tiene un papel crítico en muchos procesos biológicos incluyendo el desarrollo del esqueleto, síntesis y degradación del colágeno, mineralización del hueso, producción de citoquinas por macrófagos y células dendríticas, reclutamiento de macrófagos, maduración celular dendrítica⁶².

Estudios previos han demostrado que al realizar KO de TRAP en ratones (129SvEv), se observó en las metáfisis un mayor número de trabéculas óseas lo que es un indicativo de fenotipo osteopetrótico, sugiriendo que TRAP es fundamental para los procesos de resorción ósea, importantes para la homeóstasis normal en conjunto con la formación ósea⁶³.

Catepsina K.

La catepsina K (CTSK), una cisteína proteasa, está altamente expresada por osteoclastos que degrada muy eficazmente el colágeno tipo I, el componente principal de la matriz ósea orgánica⁶⁴⁻⁶⁵. Algunos estudios investigativos demuestran que la inhibición de CatK aumenta la masa ósea, mejora la microarquitectura y la resistencia ósea. Los recientes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares implicados en el modelado óseo y la remodelación sugieren que la inhibición de CatK disminuye la resorción ósea, pero aumenta el número de células de linaje osteoclastos⁶⁶.

MMP9.

Las metaloproteinasas de la matriz, son proteínas que degradan la matriz extracelular. En estudios previos se ha investigado la expresión de MMP9 en células RAW264.7 diferenciadas con RANKL, y se observó que la MMP9 incrementó en una manera dosis dependiente cuando las células se diferenciaron hacia OC TRAP+, igualmente, cuando se agregó un inhibidor de MAPK, p38, se suprimió la diferenciación de las células hacia osteoclastos y se bloqueó la expresión de MMP9, estos hallazgos sugieren que la diferenciación de los osteoclastos envuelve la expresión de MMP9 la cual actúa sobre la vía de las MAPK, p38, activada por RANKL⁶⁷.

ATPasa vacuolar

Esta es una bomba de protones, ubicada en el borde en cepillo, conformada por 14 subunidades, que se encuentran en 2 dominios V0 y V1; estos, actúan como una maquinaria que incluye cambios conformacionales, que van a permitir la hidrólisis de ATP hacia ADP y Pi, y de esta manera la secreción de protones hacia el microambiente óseo, que permiten la acidificación que junto con proteasas como CTSK, entre otras, empiezan a realizar la desmineralización del hueso.

Esta bomba se encuentra en la membrana especializada que forman los osteoclastos en la zona de sellado para poder realizar su función resorptiva, el borde en cepillo. En diversos estudios se ha planteado que la ATPasa vacuolar puede ser un target potencial para desarrollar agentes anti-resorptivos y de esta manera tratar las enfermedades óseas destructivas como la osteoporosis y la artritis reumatoide⁶⁸.

Especies reactivas de oxígeno en la osteoclastogénesis

Las especies reactivas de oxígeno, envuelven los iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos, los cuales son moléculas altamente reactivas ya que tienen la presencia de electrones de valencia no apareados; ellos, se forman como producto del metabolismo del oxígeno y desempeñan diferentes papeles a nivel molecular, sin embargo, cuando se encuentran aumentados pueden ocasionar daños importantes en el organismo⁶⁹.

Los efectos dañinos ocasionados por ROS han tenido mucha importancia en la última década, ya que funcionan como segundos mensajeros e inducen la activación de varios eventos de señalización celular dentro de los cuales se incluye la activación de la vía de las MAPKs, aumenta los niveles del calcio intracelular y los factores transcripcionales⁶⁹⁻⁷⁰.

Se ha evidenciado que durante la proliferación de pre-OCs se requiere un ambiente oxidante, que induce la activación de diversas vías de señalización implicadas en la regulación del estrés oxidativo y que activan la diferenciación osteoclástica, sin embargo no se conoce con exactitud el rol de ROS durante la función resortiva osteoclástica⁶⁹⁻⁷⁰.

Un regulador importante de la respuesta al estrés oxidativo es NF- κ B, proteína que desencadena la osteoclastogénesis que a su vez es activada por medio de la vía de RANKL. En estudios previos, se observó que al adicionar antioxidantes como NAC, a células BMM, hubo una disminución importante en la expresión de la proteína de NF- κ B, sugiriendo que probablemente la N-acetil cisteína, puede actuar inhibiendo la osteoclastogénesis por medio de la vía RANKL ⁷¹.

También se ha demostrado que las especies de MAPK (JNK, ERK y p38) actúan a través de ROS e inducen la diferenciación del osteoclasto, predominantemente por medio del peróxido de hidrógeno, un estudio previo mostró la adición de peróxido

de hidrógeno (H₂O₂) exógeno sólo a BMM suplementados con RANKL y se observó que pudo activar MAPK de manera dependiente de la dosis⁷².

Por otro lado, Ha y colaboradores en el 2004, encontraron que RANKL estimulaba la generación de ROS en osteoclastos. Ellos trataron osteoclastos con antioxidantes como N-acetil cisteína y glutatión, y vieron que se redujo la activación de NF-κB y ERK las cuales son inducidas por RANKL, por otro lado, observaron que los antioxidantes no previenen la activación de NF-κB inducida por TNFalfa. El tratamiento con antioxidantes también redujo significativamente la formación de los anillos de actina proceso inducido por RANKL. Finalmente, estos resultados nos indican que ROS puede actuar como un mediador de las vías de señalización osteoclástica como la de RANKL⁷³.

Adicionalmente en otro trabajo de investigación, se reportó que la función mitocondrial y los ROS juegan un rol importante en la osteoclastogénesis, lo que hicieron fue usar antioxidantes, N-acetil cisteína, ácido ascórbico y MitoQ (antioxidante específico de mitocondria), estos suprimieron la diferenciación de células RAW264.7 hacia osteoclastos TRAP+ multinucleados, inhibiendo la vía de señalización de RANKL⁷⁴.

Agentes oxidantes.

- **DMNQ: (2,3-Dimetoxi-1,4-naftoquinona)** Agente que induce formación de aniones superóxido intracelular y, dependiendo de la concentración, induce proliferación celular, apoptosis o necrosis. DMNQ no reacciona con grupos tiol libres, es no alquilante y formador de aductos en contraste con otras quinonas. Por lo tanto, DMNQ es un agente redox que genera tanto superóxido como peróxido de hidrógeno intracelularmente de una manera dependiente de la concentración. Se sabe que estos dos oxidantes se generan en una amplia gama de condiciones patológicas asociadas con la inflamación debido a la activación de las NADPH oxidasas⁷⁵. El DMNQ es una herramienta valiosa para la generación de especies reactivas de

oxígeno (ROS) con el fin de estudiar el papel de los ROS en la toxicidad celular, apoptosis y necrosis⁷⁶.

- **Homocisteína:** Es un aminoácido no esencial que contiene azufre y un producto metabólico intermedio derivado del aminoácido esencial desmetilado metionina. Es muy reactivo, ya que permite la formación de disulfuros mixtos de Hcy, la interacción de Hcy thiolactones y homocisteinilación de proteínas. La oxidación de dos moléculas de Hcy produce el disulfuro oxidado (homocistina), dos protones (H +) y dos electrones (e-), al tiempo que promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, la formación de disulfuros mixtos contribuye a la formación adicional de ROS⁷⁷.
- **Peróxido de hidrógeno:** Es un líquido covalente de color azul pálido, miscible libremente con agua y aparentemente capaz de atravesar fácilmente las membranas celulares, aunque las vías que usa para atravesar no han sido esclarecidas. El peróxido de hidrógeno es capaz de actuar ya sea como agente oxidante o como reductor. Desempeña funciones importantes en la defensa del huésped y las reacciones biosintéticas oxidativas⁷⁸.

En un estudio previo se analizó el mecanismo por el cual las defensas antioxidantes modulan la pérdida ósea, y se comparó la expresión de las enzimas antioxidantes conocidas en los osteoclastos. Se encontró que la glutatión peroxidasa 1 (Gpx), la enzima responsable principalmente de la degradación intracelular del peróxido de hidrógeno se incrementó en macrófagos de la médula ósea. Al adicionar la Gpx se disminuyó la expresión de RANKL y se evidenció un aumento de la resistencia a la oxidación mediante peróxido de hidrógeno exógeno. Esto sugiere que el peróxido de

hidrógeno es una especie reactiva de oxígeno implicada en la pérdida ósea que probablemente actúa por medio de la vía de RANKL⁷⁹.

Agentes Antioxidantes.

- **Trolox:** (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) es un análogo de la vitamina E⁸⁰. Se utiliza como antioxidante estándar en estudios bioquímicos contra los cuales se compara la capacidad antioxidante de los compuestos. Este compuesto posee actividad antioxidante y el grupo carboxilo presente dentro de su estructura imparte solubilidad en agua lo que hace que el uso de trolox sea más ventajoso respecto a otros antioxidantes activos (por ejemplo, vitamina E) ya que es sólo liposoluble⁸¹.

En la literatura se reporta que Trolox inhibe la formación de osteoclastos a partir de macrófagos de médula ósea. Trolox es efectivo solo cuando está presente durante la etapa inicial diferenciación, lo que implica que se dirige a precursores de osteoclastos. El pretratamiento con Trolox regula la inducción por RANKL de la proteína c-Fos mediante la supresión de su traducción. Lo que sugiere que Trolox previene la formación de osteoclastos y la pérdida ósea mediante la inhibición de la expresión de c-Fos en precursores de osteoclastos⁸².

- **Tempol:** Es un metal-independiente, antioxidante permeable a la membrana. Promueve el metabolismo de O₂⁻ a velocidades que son similares a SOD, superóxido dismutasa, y por lo tanto se considera un mimético SOD; Sin embargo, Tempol también facilita el metabolismo de una amplia gama de ROS y especies de nitrógeno reactivo, incluyendo radicales hidroxilo (OH⁻), y exhibe actividad de catalasa que impide además la generación de OH⁻ y H₂O₂ por reacciones de Fenton³⁸. Por consiguiente, Tempol se considera un agente de ciclo redox de uso general en lugar de un

mimético SOD específico. Tempol mejora la biodisponibilidad de NO y elimina catalíticamente la especie altamente reactiva de peroxinitrito (ONOO-) que se produce por la reacción entre O₂⁻ y NO⁸³. No se ha reportado estudios en la literatura del papel de este antioxidante sobre el osteoclasto.

- **Ácido ascórbico:** Tiene propiedades antioxidantes, contiene varios elementos estructurales que contribuyen a su comportamiento químico: la estructura de las lactonas y dos grupos hidroxilo enólico y un grupo alcohólico primario y secundario. La estructura del enediol motiva sus propiedades antioxidantes, como se puede oxidar fácilmente enediones a dicetonas. Por lo tanto, los grupos carbonilo enediones vecinos también se denominan reductivos⁸⁴.

Existen reportes de que el ácido ascórbico puede actuar como un agente reductor u oxidante dependiendo del ambiente en donde se encuentre, es decir ácido o básico, dependiendo de esto algunos estudios han demostrado que el ácido ascórbico puede inhibir⁸⁵ e inducir la formación osteoclástica⁸⁶ sin embargo no se conoce exactamente que mecanismo usa y tampoco se conoce exactamente como actúa.

- **N-acetil cisteína (NAC):** Es un antioxidante tiol bien conocido, es el precursor acetilado de la L-cisteína, fácilmente absorbido por las células, desacetilado y convertido en glutatión⁸⁷. También es conocido como un agente reductor que puede modificar directamente la actividad de varias proteínas. N-acetil cisteína es un fármaco análogo de cisteína con muchas aplicaciones terapéuticas, se ha visto en algunos estudios que tiene un papel protector en el control del estrés oxidativo contra muchas células incluyendo

osteoblastos y osteoclastos, tanto como un eliminador directo de ROS como un compuesto capaz de aumentar los niveles de glutatión celular (GSH)⁸⁸.

Agonistas de PPAR gamma.

Los receptores activados por proliferador de peroxisoma (PPAR) son factores de transcripción activados por ligandos que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Los PPARs son activados por ligandos naturales tales como ácidos grasos, eicosanoides y ácidos grasos oxidados, proteínas de la inflamación y crecimiento celular⁸⁹. Debido a esto el PPARg es un objetivo para el tratamiento de la diabetes tipo II, enfermedades inflamatorias y cáncer.

El factor de transcripción activado por el proliferador de peroxisoma- γ y sus agonistas como DHA, retinol⁹² y las tiazolidinedionas como Rosiglitazona, interfieren con la vía NF- κ B, al unirse al complejo p65 de NF- κ B impidiendo su activación y de ésta manera su traslocación al núcleo⁹⁰ o también se ha evidenciado en el caso del Retinol, que este lo puede hacer por medio de la disminución de la expresión del factor NFATc1 que es activado por NF- κ B⁹².

A pesar de estas evidencias, existen reportes que demuestran un efecto contrario, en donde la aplicación de tiazolidinedionas⁹¹ y de DHA dan como resultado un aumento en la actividad resortiva posiblemente por mecanismos independientes de NF- κ B; probablemente a partir de la activación de c-Fos por medio de la unión a PPAR-gamma y del aumento de NFATc1 respectivamente, y de esta manera inducen el linaje osteoclástico⁹¹.

Fuerzas en la actividad resortiva.

La fuerza mecánica tiene efectos diferentes e importantes en el tejido óseo. Existen diferentes modelos in vivo e in vitro usados para estudiar el efecto de la carga mecánica en el metabolismo óseo, en la formación (Osteoblasto) y en la resorción (osteoclasto) del hueso. El hecho de que exista la posibilidad en biología molecular

de suprimir un gen por medio de ratones Knock out ayuda a mejorar el estudio de la expresión genética; esto junto con los modelos ortodónticos en ratones que son una ventaja para entender los mecanismos moleculares del movimiento dental y de la carga mecánica sobre el hueso⁹³.

El movimiento dental provocado por la fuerza mecánica, induce en las células, ligamento periodontal, hueso alveolar y tejidos adyacentes, una respuesta mecánica la cual es transformada en una respuesta biológica mediada por diferentes factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y hormonas que están implicadas en este proceso⁹⁴.

Por otro lado, el tejido óseo responde a los estímulos mecánicos transformando esa fuerza física en una señal química que es transmitida a las células por medio de la mecanotransducción, definida como el proceso mediante el cual las células convierten la energía mecánica, incluida la energía electromagnética, la gravedad, la tensión, la compresión y el cizallamiento, en señales eléctricas y / o bioquímicas⁹⁵.

Las moléculas de señalización celular como el ATP, prostaglandinas y óxido nítrico son las responsables de coordinar la respuesta al estímulo mecánico. Los osteocitos son los reguladores clave en la mecanotransducción y son las principales células del hueso que responden a un estímulo mecánico y regulan la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos⁹⁶. Sin embargo existen estudios que demuestran que los osteoblastos y osteoclastos son capaces de responder por si solos a un estímulo mecánico.

Modelos in vitro de estudio de la aplicación de fuerza mecánica.

Delaine-Smith y colaboradores en el año 2015, crearon un artículo en el cual establecieron varios modelos in vitro para estudiar el proceso de mecanotransducción. A continuación, se describirán los más usados en investigaciones:

- Vibración: Este es el método más común para estudiar la fuerza sobre las células óseas, en este sistema las células son sembradas en una placa de pocillos múltiples, que contiene colágeno; la placa es unida a una plataforma de carga la cual va a realizar el movimiento vibratorio con una frecuencia variable⁹⁷.
- Flujo de fluido: Este se caracteriza por ser continuo o discontinuo, existen dos métodos de fluido, el primero un simple método de balanceo "see-saw" y el segundo un sistema de flujo de placas paralelas, ambos producen un perfil de fluido oscilatorio⁹⁸⁻⁹⁹⁻¹⁰⁰.
- Cultivo oscilante "see-saw": Consiste en un sistema de balanceo puede producir un movimiento oscilante de baja magnitud (por ejemplo, 0,001-0,25 Pa) que se transmite a las células sembradas en platos de cultivo estándar¹⁰¹.
- Cámara de flujo de placas paralelas: El sistema de flujo de placas paralelas es capaz de producir tensiones de cizallamiento y es usada para mirar la respuesta de las células al fluido de flujo. Este sistema puede realizar diferentes perfiles de fluido, continuos, pulsátiles u oscilatorios ⁹⁸⁻¹⁰².
- Sistema de tensión "FlexCell": En este sistema las células son sembradas en platos de cultivo FlexCell, se colocan las placas en una placa de base y se aplica una tensión cíclica de duración estática o variable definida utilizando el software FlexSoft FX-5000¹⁰³.
- Fuerza compresiva por medio de la aplicación de matrices: este es un sistema de aplicación de fuerza compresiva que consiste en cortar rodajas

de silicona de 12 mm de diámetro y 2mm de ancho. Estas deben esterilizarse y se colocan en las placas de 24 pocillos sobre las cuales se siembran las células. Seguido a esto las células colocadas sobre las rodajas de silicona, se invertirán y se colocarán sobre capas de gel de colágeno, y se comprimirán continuamente con capas de 3, 5, 7, 9 o 14 rodajas de silicona (~ 43 mg / cm²) por 24 h, respectivamente. En el grupo de control, las matrices con las células unidas se invierten sobre la capa de gel de colágeno sin aplicación de ninguna fuerza adicional¹⁰⁴.

Células óseas y estímulo mecánico.

Hay amplias pruebas de que la mayoría de las células del cuerpo son capaces de percibir su entorno mecánico. De hecho, parece haber una generalidad en las respuestas celulares a la fuerza mecánica.

La estimulación mecánica varía ampliamente en amplitud y frecuencia dependiendo de las actividades habituales del individuo. La mayoría de las actividades normales de locomoción asociadas con la marcha y el ejercicio se realizan a frecuencias cercanas a 1 Hz (Fritton et al., 2000; Thompson et al., 2012). La frecuencia de paso está entre 1.7 Hz y 2.3 Hz y para trote, entre 2.5 Hz y 3.2^{105,106}.

La carga mecánica tiene una gran influencia en el esqueleto ya que puede estimular una serie de eventos intra e intercelulares para inhibir o estimular la resorción ósea o la formación ósea, dependiendo de la frecuencia y la amplitud aplicada a la célula correspondiente^{105,107}.

Osteocito.

Los osteocitos son células que orquestan la regulación bioquímica de la masa y estructura ósea a partir de un estímulo mecánico¹¹⁰. Son las células encargadas de realizar la mineralización ósea, y su cuerpo celular reside en espacios llamados

lagunas. De cada cuerpo celular del osteocito, aproximadamente 50-60 procesos celulares se originan e irradian a través de la matriz mineralizada a través de espacios llamados canalículos^{110,111}.

Estos procesos celulares irradian en diferentes direcciones y forman una intrincada red intercelular de osteocitos, que está directamente conectada a las células que recubren la superficie del hueso y las células dentro de la médula ósea¹¹⁰.

Existe cada vez más evidencia de modelos matemáticos y experimentales que sugieren que las fuerzas mecánicas sobre el hueso inducen el flujo de líquido en la porosidad lacunar-canalicular en el osteocito^{107,108,109}.

Los mecanismos por los cuales el osteocito responde a un estímulo mecánico todavía no están claramente explicados. Sin embargo, el citoesqueleto juega un papel clave en ello. El citoesqueleto, está compuesto por actina, microtubulos, filamentos, canales de conexión, entre otras¹¹² y algunas de las proteínas más importantes que conectan mecánicamente la célula exterior al citoesqueleto; a continuación, se describen estos diferentes mecanorreceptores encontrados en el osteocito.

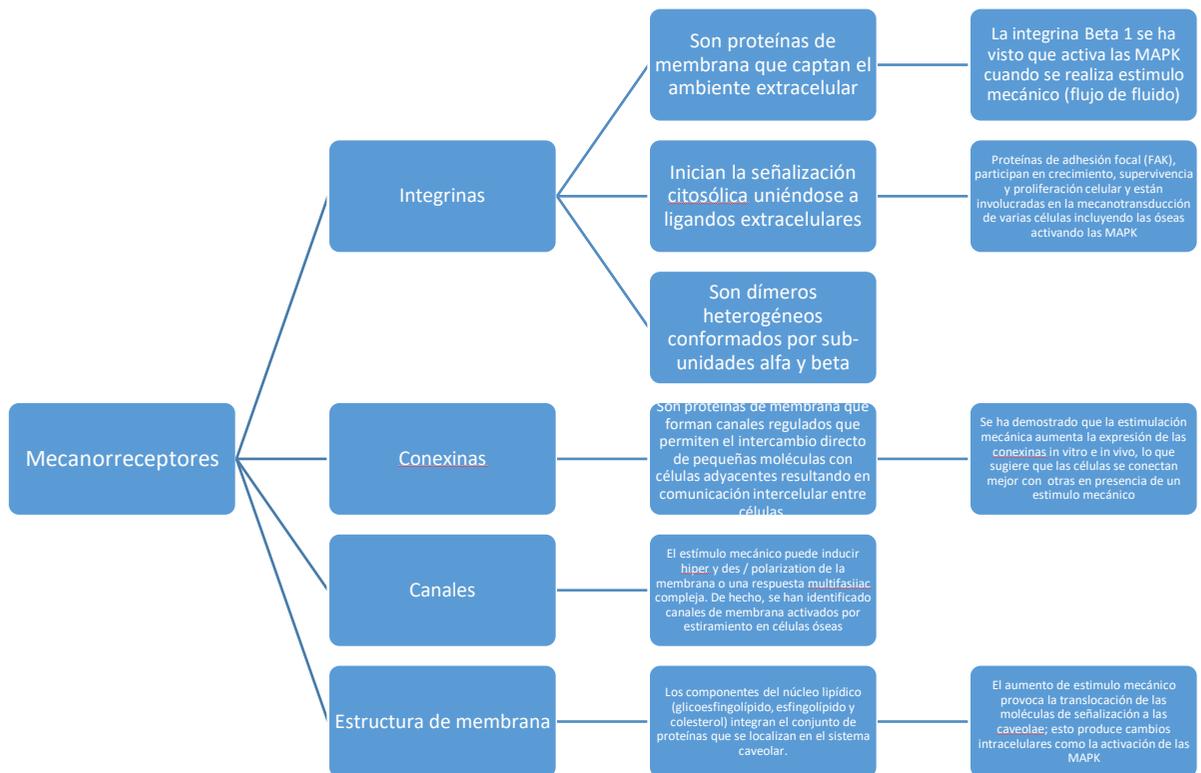


Gráfico 1. Tipos de mecanorreceptores en tejido óseo. Elaboración propia. 2017.

Existe evidencia de que el osteocito, puede liberar algunas que estimulan o inhiben la diferenciación del osteoblasto o el osteoclasto, induciendo así la resorción o formación ósea respectivamente¹¹³.

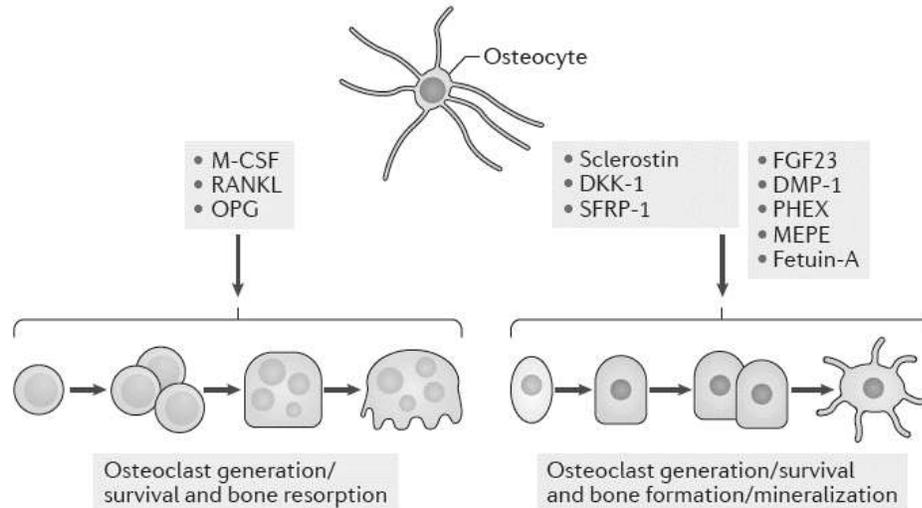


Figura 3. Osteocito, regulación de formación y resorción ósea. Fuente: LI Plotkin, T Bellido. Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. Nat Rev Endocrinol. 2016;12(10):593-605.

Al aplicar un estímulo mecánico sobre el tejido óseo, el osteocito produce la activación de diversas vías de señalización, que actúan en el mantenimiento de la homeostasis ósea, por medio de la baja regulación de la esclerostina, activación de FAK (proteínas de adhesión focal) y ERK (Quinasa regulada por señal extracelular) como se muestra en el siguiente esquema:

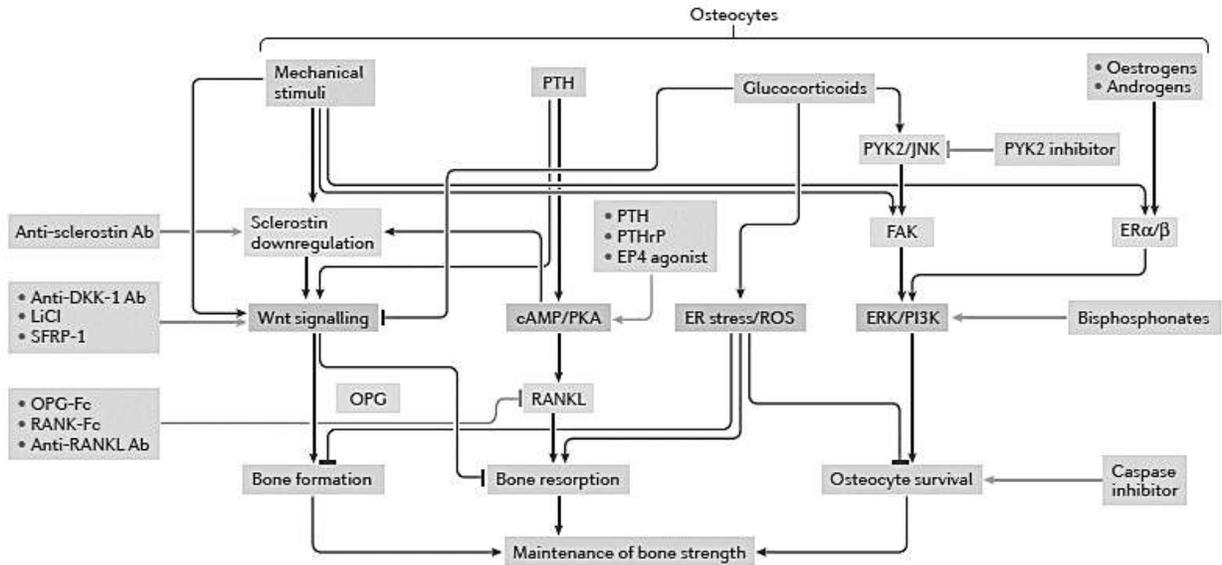


Figura 4. Vías de señalización osteocíticas. Fuente: LI Plotkin, T Bellido. Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(10):593-605.

Osteoblasto.

La estimulación mecánica puede inducir la secreción de hormonas y factores de crecimiento, afectando así la diferenciación y el potencial de proliferación de los osteoblastos¹¹⁴.

Una vez el osteocito recibe la señal mecánica, éste genera un flujo de fluido que induce el movimiento de fluido extracelular a través del sistema laguno-canalicular estimulando así las células óseas. En el osteoblasto molecularmente se desencadena la activación de diversas vías de señalización entre las cuales se incluyen la prostaglandina E2 que su vez promueve la expresión del factor osteoblastogénico osterix. Por otro lado, el estímulo mecánico conduce la activación de otra vía de señalización que lleva a la sobre regulación del factor de crecimiento insulínico-I, lo que produce la activación de factores de crecimiento como el fosfatidinositol-3-quinasa (PI3K), MAPKs y proteínas SMAD^{114,115,116}. A continuación se muestran otras vías de señalización activadas por el estímulo mecánico en el osteoblasto.

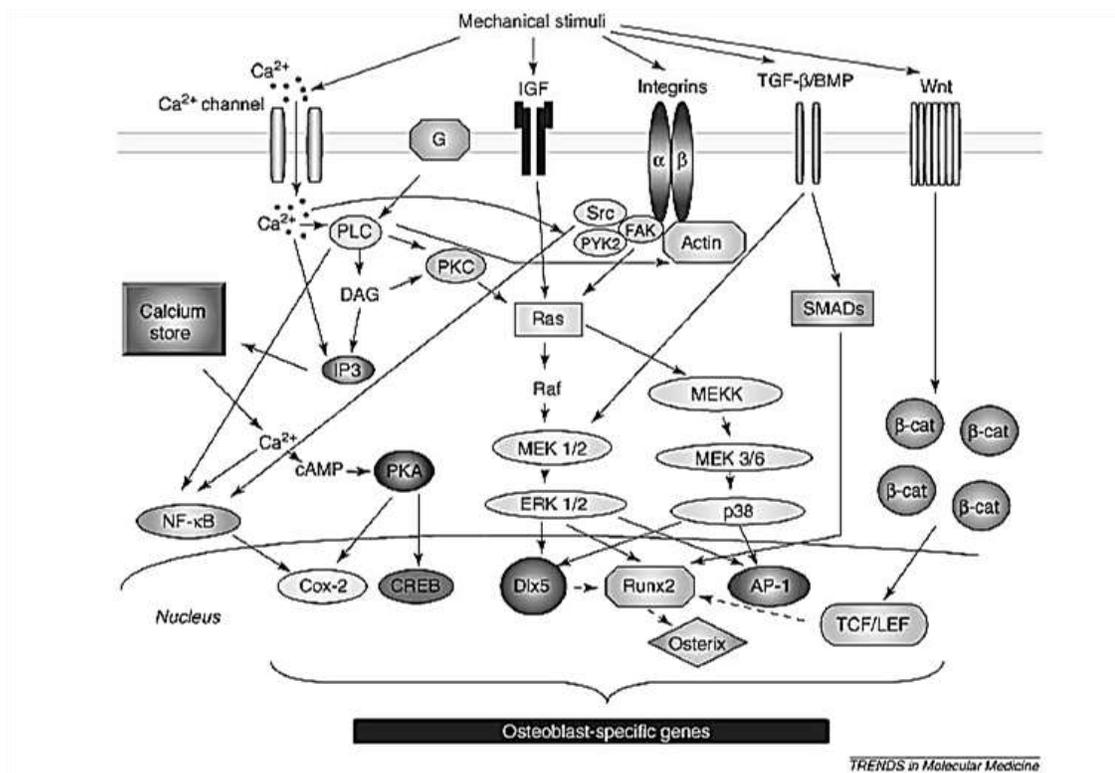


Figura 5. Vías de señalización activadas por el estímulo mecánico implicadas en la Osteoblastogénesis. Fuente: 114. H Kitaura, K Kimura, M Ishida, H Sugisawa, H Kohara, M Yoshimatsu, et al. Effect of cytokines on osteoclast formation and bone resorption during mechanical force loading of the periodontal membrane. ScientificWorldJournal. 2014;2014:617032.

Osteoclasto.

Experimentos in vivo, como correr, saltar, nadar, escalar, entre otros, han servido para evaluar el efecto del estímulo mecánico sobre el metabolismo óseo. En el hueso y tejido periodontal, la fuerza mecánica induce respuestas biológicas de las células del ligamento periodontal, hueso alveolar y tejidos adyacentes que son transformadas en una respuesta biológica mediada por diferentes factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y hormonas lo que desencadena la activación de diferentes vías de señalización en el osteoclasto^{114,115,116,117}.

RANKL.

Un estudio realizado a pacientes humanos demostró como los niveles de RANKL y OPG varían alrededor de implantes de mini tornillo como resultado de la aplicación de fuerza ortodóntica a diferentes intervalos de tiempo. Ellos tomaron 20 implantes a los que se les realizó carga y 16 sin carga en este estudio. Todos los implantes miniscrew se colocaron bilateralmente entre los segundos premolares superiores y los primeros molares como unidades de anclaje para la distalización canina. El fluido crevicular del implante periférico se extrajo de las caras mesiobucales de los implantes miniscrew con carga y sin carga, antes de la carga; A las 24, 48 y 168 horas; y al día 30 después de la aplicación de la fuerza. Se usaron kits de ensayo de inmunoabsorción enzimática para determinar los niveles de RANKL y OPG en las muestras de fluido crevicular del implante. Los resultados de este estudio mostraron que la cantidad total de RANKL se elevó significativamente en el grupo de implantes miniscrew cargado en todos los periodos de tiempo, lo que sugiere que la carga mecánica ortodóntica puede influir sobre el osteoclasto por medio de la activación de la vía de RANKL, induciendo actividad resortiva aumentada¹²¹.

TNF-alfa y M-CSF.

Estudios previos han demostrado que el movimiento ortodóntico incrementa los niveles de TNF-alfa en el surco gingival en humanos¹¹⁸⁻¹¹⁹. En un trabajo de investigación se recolectó el TNF del surco, para lo cual se introdujeron perlas paramagnéticas, recubiertas con anticuerpos monoclonales para TNF, en el surco gingival de 50 dientes sometidos a movimientos dentales ortodónticos (por dos sistemas de fuerza) en 20 pacientes. La recuperación se realizó mediante un dispositivo magnético permanente diseñado para ajustarse al surco periodontal. Las muestras se tomaron antes de la aplicación de fuerza (controles); y en un tiempo fijo después de la aplicación de la fuerza. La cantidad de TNF inmunoabsorbido se cuantificó con un ensayo inmunoquímico. La conclusión de esta investigación es que la cantidad de TNF, que se encuentra en el surco gingival

humano, se eleva durante el movimiento dental, debido a la compresión realizada en el tejido óseo adyacente a la raíz dental¹¹⁹⁻¹²⁰.

En otro estudio realizado por Kitaura y colaboradores realizaron un estudio que tuvo como objetivo examinar el efecto de un anticuerpo anti-c-FMS sobre la osteoclastogénesis y la osteólisis inducida por carga mecánica en un modelo de movimiento ortodóntico en ratones. Utilizaron ratones deficientes en receptores 1 y 2 del TNF, demostraron que el movimiento ortodóntico del diente estaba mediado por TNF-. Usaron anticuerpos anti-c-FMS, por 12 días, diariamente, durante la carga mecánica. El anticuerpo anti-c-FMS inhibió significativamente el movimiento dental ortodóntico, redujo notablemente el número de osteoclastos in vivo e inhibió la osteoclastogénesis inducida por TNF in vitro. Estos hallazgos sugieren que el M-CSF juega un papel importante en la osteoclastogénesis inducida por carga mecánica y la resorción ósea durante la ortodoncia¹²².

Antecedentes de estímulo mecánico en el osteoblasto y osteoclasto.

Grigoriadis y col. en el año 2010 demostraron que la estimulación mecánica aplicada a células similares a osteoblastos resultó en un perfil osteopetrótico, lo que hicieron fue realizar estiramiento mecánico cíclico (4000 mε de alargamiento a una frecuencia de 1 Hz) aplicado a células BMSC y C3H10T1 / 2 y evaluaron actividad de fosfatasa alcalina, y marcadores osteoblastogénicos como RUNX2 y Osterix, entre otros.

Por otro lado, un estudio en donde se realizó la aplicación de vibración a 3,0 g y 45 Hz de frecuencia, a células Raw264.7 diferenciadas hacia osteoclastos, disminuyó la actividad de los osteoclastos en el esqueleto del ratón adolescente, proporcionando evidencia del potencial antirresortivo de la vibración¹²³.

Hay varios reportes de la literatura que demuestran que la aplicación de estímulos mecánicos dependiendo de la magnitud y frecuencia utilizadas, sobre las células óseas, determina el efecto sobre las mismas.

Xu y colaboradores en el año 2012 observaron que aplicar estímulos mecánicos a diferentes magnitudes sobre células RAW264.7 diferenciadas hacia osteoclasto con RANKL y M-CSF, tuvo efectos diferentes sobre las mismas. Cuando aplicaron magnitudes menores a 1000 microelongaciones, se observó menos número de osteoclastos, lo que aumentó cuando se aumentaron las microelongaciones desde 1500 hasta 2500. Sin embargo cuando se aumentó la magnitud a 5000 $\mu\epsilon$ se disminuyó ese número de osteoclastos lo que se asoció a una apoptosis¹²⁴.

A continuación, según estudios previos realizados a las células óseas y reportados en la literatura, se encontrará una tabla que describe cómo actúan las diferentes magnitudes y frecuencias sobre las células óseas.

Magnitud	Frecuencia	Osteoclasto	Osteoblasto
<ul style="list-style-type: none"> • Baja= <100 $\mu\epsilon$ • Media= 100-1000 $\mu\epsilon$ • Alta= >1000 $\mu\epsilon$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja= <1 Hz • Media= 1-10 Hz • Alta= >10 Hz 	<ul style="list-style-type: none"> • Inductor: > 1000 $\mu\epsilon$ > 1 Hz • Inhibidor: < 1000 $\mu\epsilon$ > 5000 $\mu\epsilon$ < 1 Hz <p>• Kulkarnietal 2013; Rubinetal 1999; Rubinetal 2000; Suzuki etal.,2008</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Inductor: < 100-1000 $\mu\epsilon$ Entre 0,5-1,5 Hz <p>• Hsieh and Turner, 2001; Roblingetal 2006; Turneretal 1994.</p>

Tabla 1. Magnitudes y frecuencias sobre osteoblasto y osteoclasto. Elaboración propia.

MATERIALES Y MÉTODOS.

LÁMINAS DE HUESO.

Se usó hueso cortical de escápula bovina, láminas de aproximadamente 5 mm de ancho y largo por 0.5 de grueso, se cortaron con una pulidora con disco de carburo de grano grueso, posteriormente se pulieron con micromotor eléctrico, piedra rosada y discos de carburo de grano fino, y por último se lijaron manualmente hasta obtener láminas de hueso con superficies homogéneas. Las láminas de hueso se sumergieron en una solución de SDS al 10% por 8 horas bajo agitación continua, se lavaron doce veces con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, se esterilizaron con etanol al 70% por 60 minutos, finalmente se dejaron bajo luz U.V durante 1 hora. ¹²⁵⁻¹²⁶.

CULTIVO DE CÉLULAS U937 EN LÁMINAS DE HUESO.

Se tomaron aproximadamente 800.000 células de la línea U937, las cuales se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se realizó la viabilidad de las mismas, por medio del uso de azul de tripan al 0,4 % en solución salina isotónica tamponada estéril (PBS pH 7.2- 7.3), este tiñe a las células que presentan daño en la membrana plasmática y permite discriminar entre las células vivas de células muertas. Posterior a realizar viabilidad, se procedió a sembrar por lámina de hueso 30.000 células aproximadamente, con 30 µl de RPMI, estas se dejaron incubando a 37C^o, 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%, durante dos horas para que se pudieran adherir las células al hueso. Pasadas las dos horas de incubación, se adicionó 400 µl a cada pozo de RPMI suplementado con SFB al 10%; y por último se dejaron incubando a 37C^o, 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%, con y sin fuerza centrífuga durante los días correspondientes¹²⁵.

APLICACIÓN FUERZA CENTRÍFUGA

Se aplicaron 3 velocidades de fuerza las cuales se describen en la **Tabla 2**. Lo que se buscó con ello, fue observar y describir como las diferentes intensidades actuaban sobre el hueso, para de esta manera estandarizar cada una, observando la actividad TRAP y resortiva; con estos resultados se tomó la fuerza que se aplicó durante toda la investigación.

Las células se sembraron sobre la lámina de hueso, como se describió anteriormente. Luego se colocaron en un motor rotatorio horizontal (Rototorque – ColeParmer®) a velocidades establecidas en la **Tabla 2**, la fuerza permaneció constante durante 5 días en incubadora a 37C°, 95% de humedad y atmosfera de CO2 al 5%. Para calcular la fuerza ejercida sobre las células se aplicó la siguiente fórmula: $P = (m \times r \times r.p.m^2 \times \pi^2) / (A \times 9.8 \times 900)$. 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= 3, 30 u 80¹²⁷. La fuerza ejercida se muestra en la **Tabla 2**.

Las células se fijaron al día 1,3 y 5 de realizada la fuerza, durante 40 minutos a 4 °C con paraformaldehído al 4% , luego se dejaron 15 minutos de pre-enfriado a 0° C y se realizaron tres lavados con 200 µl de PBS. Luego, se dejaron en 200 µl de PBS y llevaron al refrigerador a 4 °C. Posteriormente se evaluó la actividad de la enzima TRAP y la actividad resortiva de cada lámina de hueso.

La fuerza centrífuga se aplicó paralela al plano en el que se encontraban las células, a un ángulo de 180, la cual tenía como objetivo desprender las células del hueso; sin embargo probablemente podemos decir que las células resistieron este desprendimiento y simplemente intentaron desplazarse sobre la superficie ósea en la cual fueron sembradas generando estrés.

Rototorque ColeParmer®



Tabla 2. Tipos de fuerza ejercida, velocidad y revoluciones por minuto.

Velocidad	r.p.m	Fuerza ejercida
Baja	3	$2,4 \times 10^{-6} \text{ gr/cm}^2$
Media	30	$2,4 \times 10^{-4} \text{ gr/cm}^2$
Alta	80	$1,74 \times 10^{-3} \text{ gr/cm}^2$

EVALUACIÓN DE ROS

Con el fin de determinar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), las láminas de hueso donde previamente se sembraron las células U937 sometidas a fuerza centrífuga y que fueron tratadas con agentes oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma, se retiraron del medio y se secaron cuidadosamente

con una toalla de papel para ser transferidas a otra caja de 48 pocillos, fueron tratadas con Dihidroetidio (DHE) a una concentración de 10 μ M y Hoechst (1 μ g/ml) en medio de cultivo, se llevaron a 37 °C con CO₂ al 5% y humedad relativa del 95% por 30 minutos; pasado este tiempo, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos más. Luego, las láminas se lavaron 3 veces con PBS.

Posteriormente, las láminas óseas, se colocaron sobre una lámina portaobjetos de vidrio y se analizaron en microscopio invertido de fluorescencia (Kaika) con un objetivo 40X, en donde se tomaron 10 fotos representativas por cada lamina de hueso y los niveles ROS se determinaron en cada fotografía cuantificando la intensidad de fluorescencia con el programa ImageJ 1.3 (Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible gratis en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), los niveles se expresaron en intensidad media de fluorescencia (ver anexo 1). Este ensayo fue realizado por triplicado y se repitió tres veces;

CTCF = Densidad integrada - (Área de la célula seleccionada X Fluorescencia media del background).

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE A TARTRATO (TRAP)

Se determinó si las células mononucleadas expresaban fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) un marcador de los osteoclastos. A las láminas de hueso se les adicionó una solución compuesta por: 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 μ l de pararrosanilina hexasotizada y 375 μ l 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, y se agregó 300 μ l de esta tinción a cada lámina de hueso. Para acentuar la tinción TRAP, se adicionó 30 μ l de hematoxilina durante 15 segundos y por último se incubaron las láminas de hueso a 37C°, 95% de humedad y atmosfera de CO₂

al 5% durante 2 horas. Pasado este tiempo, se lavaron los huesos 3 veces con 200 μ l de PBS¹²⁵⁻¹²⁶.

La coloración TRAP de acuerdo a las concentraciones de los reactivos y de los tiempos de incubación pueden variar entre una coloración rojo ladrillo, café y rojo violeta. Para evaluar la actividad TRAP, se observó al microscopio de luz Eromex Hollland, con un objetivo de 20x. Se realizó un conteo de las células coloreadas en las láminas de hueso cortical bovino, y se dividieron respecto al área del hueso (determinada con un conteo de campos en el objetivo 20X multiplicado por 0,16 mm²) y de esta manera se determinaron las células TRAP+ por área de hueso. Por último se realizó un registro de 10 fotografías por hueso con cámara digital.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA

Se retiraron las células para poder observar las lagunas de resorción, posterior a la tinción y observación de ROS, Actina y TRAP, las células se lisaron con buffer RIPA 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 Tolluidina método estándar, para aumentar contrastes en la superficie de las láminas de hueso una vez removidas las células.

La tinción de azul de Tolluidina se aplicó 400 μ l a cada pozo y se dejaron tapados por 15 minutos. Las láminas de hueso se decoloraron con metanol, o agua destilada cambiando varias veces la mezcla hasta que no se desprendió más colorante y alternando cada lavado de 400 μ l con agua destilada. Finalmente se dejaron con 200 μ l de la solución para decolorar la tinción en cada pozo. Las láminas se secaron con servilleta, sin presionar y al medio ambiente, seguido de esto se realizó el conteo para lo cual se tomaron 10 fotografías representativas de cada lámina. Finalmente se evaluaron con el objetivo 20 X en un microscopio de luz Euromex Holland, y se midió el extendido de la resorción o lagunas, mediante el programa computacional de análisis de imágenes (ImageJ 1.3, Wayne Rasband

National Institutes of Health, disponible gratis en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se expresaron en porcentaje total de área resorbida usando la siguiente fórmula.

$$\text{Porcentaje de resorción} = \text{Área resorbida del hueso} \times 100 / \text{área total}$$

ANÁLISIS DE MARCADORES OSTEOCLÁSTICOS INMUNOFLUORESCENCIA

Para determinar si las células U937 sometidas a fuerza centrífuga y tratadas con antioxidantes, oxidantes y agonistas de PPAR-gamma expresaban alguno de los marcadores osteoclastogénicos: se realizó inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron anticuerpos policlonales de fusión y actividad (OC-STAM, DC-DTAMP, CTSK, MMP9, V-ATPase, ADAM 12) y de diferenciación osteoclastica (PPARg, NFkB, NFATc1). Ver Tabla 3.

Para esto, a las células fijadas cultivadas sobre la lámina ósea se les retiró del PBS, se secó la lámina ósea por debajo, con una servilleta. Se adicionó 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 lavó 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 BiotechnologyR) junto con la tinción DAPI, y se incubó durante 15 min a 15 °C en cámara húmeda, protegido de la luz. Se realizaron lavados con 200 µl de PBS cada 5 minutos por 3 veces. La muestra se analizó en un microscopio de fluorescencia (SDP Top) con un objetivo 40X. Se evaluó toda la superficie de la lámina de hueso y tomaron entre 7 y 10 fotografías representativas por lámina por medio del software Mlvimage Flu.

Tabla 3. Lista de anticuerpos evaluados

Antígeno que reconoce	Origen	Tipo	Concentración	Fluorógeno conjugado	Casa comercial
DC-STAMP	Ratón	IgG	10 ug/ml, 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
OC-STAMP	Conejo	IgG	10 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
Catepsina K	Conejo	IgG	200 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
Metaloproteinasa 9	Cabra	IgG	200 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
V-Atpasa	Cabra	IgG	200 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz

Adam 12	Cabra	IgG	200 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
PPARγ	Conejo	IgG	200 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
NF-κB	Cabra	IgG	200 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
NFATc1	Ratón	IgG	10 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz
SINCITINA-1	Cabra	IgG	200 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz

CD47	Ratón	Ig G	20 ug/ml-80 ug/ml 1:1000 uL	FITC	Santa cruz

SIEMBRA Y TRATAMIENTO CON AGENTES REDUCTORES Y OXIDANTES:

Se colocó una lámina de hueso estéril por pozo en cajas de 48 pocillos, se sembraron 20µl células/hueso (30.000 células) re suspendidas en RPMI con SFB al 10%, tratadas o no con PEG, fueron mantenidas bajo una atmosfera humidificada al 5% de CO₂ a 37°C durante 2 horas para permitir su adherencia a la lámina de hueso. Posteriormente los pozos se llevaron a un volumen final de 200µl de DMEM con SFB al 10%.

A las células en cultivo se les realizó inducción oxidativa aplicando DMNQ 0.15µM, Homocisteina 100Mm, o tratamiento con agentes reductores trolox 500µM, tempol 100µM, ácido Ascórbico 50µg/ml, NAC 30mM, DHA 40µM, y retinol 20µM. Las concentraciones fueron establecidas según los reportes previos de la literatura sobre su uso en osteoclastos o células U937 que se muestran en la **Tabla 4.** y se realizó curva de viabilidad. Finalmente se colocaron en el rotor para realizar fuerza centrífuga.

Tabla 4: Caracterización de concentraciones de agentes oxidantes y antioxidantes en osteoclastos.

Reactivo	Concentraciones reportadas en la literatura	Tipo de células reportadas en la literatura	Concentración definida para este estudio
DMNQ¹²⁸⁻¹²⁹ Sc-202586 Santa Cruz Biotechnology	0, 1, 2, 4, 8,16 μ M. Final: 4 μ M 0.05, 0.1, 0.2, 1, 5 μ M Final:0.208 μ M	U937 PBMC de hombres y mujeres adultos	0.15 μ M
Homocisteina¹³⁰ Sc-214939 Santa Cruz Biotechnology	0, 10, 50, y 100 μ M Final: 100 μ M 5, 10, 50, 100 μ M Final: 100 μ M	PBMC de hombres adultos BMMS de ratón	100 μ M
Trolox¹³¹ Sc-200810 Santa Cruz Biotechnology	100,200,500 μ M Final: 500 μ M	BMMS de ratón	500 μ M

Tempol¹³² Sc-200825 Santa Cruz Biotechnology	100µM	PBMC de hombres y mujeres de edad adulta	100µM
Ácido ascórbico¹³³⁻ 134	0, 10, 50 y 100 µg/ml Final: 50 µg/ml	RAW 264.7	50µg/ml
NAC¹³⁵	1, 3, 10 y 20 mM Final: 20mM	RAW 264.7	30mM
DHA¹³⁶	20, 40 y 80 µM Final: 40 µM	Monocitos de sangre periférica	40 µM
Retinol¹³⁷	2,4 y 8 nM Final: 20 nM	Monocitos de sangre periférica RAW264.7	4 nM

ENSAYO DE VIABILIDAD

Las Células U937 y sembradas en cajas de 96 pocillos con 30.000 células/pozo, en medio DMEM con SFB al 10% a un volumen final de 200µl, en presencia de los agentes oxidantes y reductores, fueron sometidas a ensayo de viabilidad será medida durante 3 días de cultivo y se realizará una curva; para esto se tomó una

muestra de 5µl de células de cada pozo y 5µl de azul tripán al 0.4% en solución salina isotónica tamponada estéril (PBS pH 7.2- 7.3), se realizó el recuento de las células en una cámara hemocitométrica de Neubauer en un microscopio de luz invertido marca Euromex Holland, siguiendo la ecuación: Número de células = $(V/\#Q) * FT * FN * VS$, donde, V= Número total de células viables contadas; #Q = Número de cuadrantes contados; FT= Factor de dilución (2); FN = Factor de la cámara de Neubauer (10^4); VS = Volumen en ml de la solución que contiene las células. La viabilidad se expresará en términos de porcentaje según la ecuación: $\% = (V * 100) / T$, donde, T = número total de células (viables y no viables) contadas en la cámara.

EVALUACIÓN DE ANILLOS DE ACTINA.

Se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 min y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% por 10 min. Luego, se lavaron tres veces con PBS seguido de un bloqueo con 0.2% de albumina bovina y 0.1% de saponinas disueltos en PBS. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos monoclonales anti-actina toda la noche a 4°C, se lavaron con PBS y se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón junto con faloidina (0.33 µM) y DAPI (0,1µg/ml), se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Luego, se lavó tres veces con PBS y se analizó en un microscopio invertido de fluorescencia (SDP top) con un objetivo 40X. Este ensayo fue realizado por triplicado; Se evaluó toda la superficie de la lámina de hueso y tomaron entre 5 y 10 fotografías representativas por lámina por medio del software Mlvmage Flu.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron expresados como la media, ± el error promedio de la media de los experimentos independientes para cada condición experimental. La diferencia de los grupos de los tratamientos se analizó con el programa Graphpad por el método de ANOVA de una vía. Para evaluar el grado de correlación entre las variables se realizó una prueba de correlación de Tuke'y.

RESULTADOS

Viabilidad celular, expresión de la enzima TRAP y actividad resortiva al día 1,3 y 5 de cultivo, en células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-6} ; 2.4×10^{-4} o 1.74×10^{-3} gr/cm² (3, 30 u 80 r.p.m.).

Para determinar los cambios en la viabilidad, la actividad TRAP y resortiva de células U937 sometidas a fuerza centrífuga, 30.000 células U937 se resuspendieron repetidamente para que todas las células quedaran bien disgregadas antes de sembrarlas y se observaron como células mononucleares. Seguido a esto, se buscó determinar si existían diferencias al aplicar las tres modalidades de fuerza: 2.4×10^{-6} ; 2.4×10^{-4} o 1.74×10^{-3} gr/cm² (3, 30 u 80 r.p.m.) o al aplicar la fuerza en diferentes días: 1, 3 y 5 días. Al cabo de este tiempo se fijaron con paraformaldehído al 4% y se procedió a evaluar viabilidad celular mediante la tinción con azul de tripan.

Como se observa en la figura 1a. ninguna de las 3 diferentes fuerzas mostraron cambios en la viabilidad cuando se comparan las células sometidas a fuerza centrífuga respecto a las no sometidas a fuerza (control). Sin embargo, se observa una tendencia a disminuir la viabilidad celular cuando se aplicó la fuerza con las tres diferentes frecuencias al primer día, en donde pasó de un 95% a un 80%, y al tercer y quinto no se evidencia cambios importantes.

Seguido de esto, se evaluó la actividad TRAP y se observó a las 24 horas de aplicar la fuerza, que los 3 diferentes grupos con fuerza, presentaron un aumento significativo, comparado con el control de no fuerza, en el número de células TRAP+ aumentando un 11, 29 y 29% respectivamente. Por otro lado, es importante resaltar que todas las células fueron bien disgregadas antes de sembrarlas, y se observaron como células mononucleares, debido a que no se indujeron a fusión previamente.

En el tercer y quinto día de aplicar la fuerza centrífuga, comparado con el control, los tres grupos de fuerza, baja, media y alta aumentaron de manera muy significativa el número de células mononucleares TRAP+, evidenciándose que a mayor fuerza ejercida mayor es el número de células TRAP+.

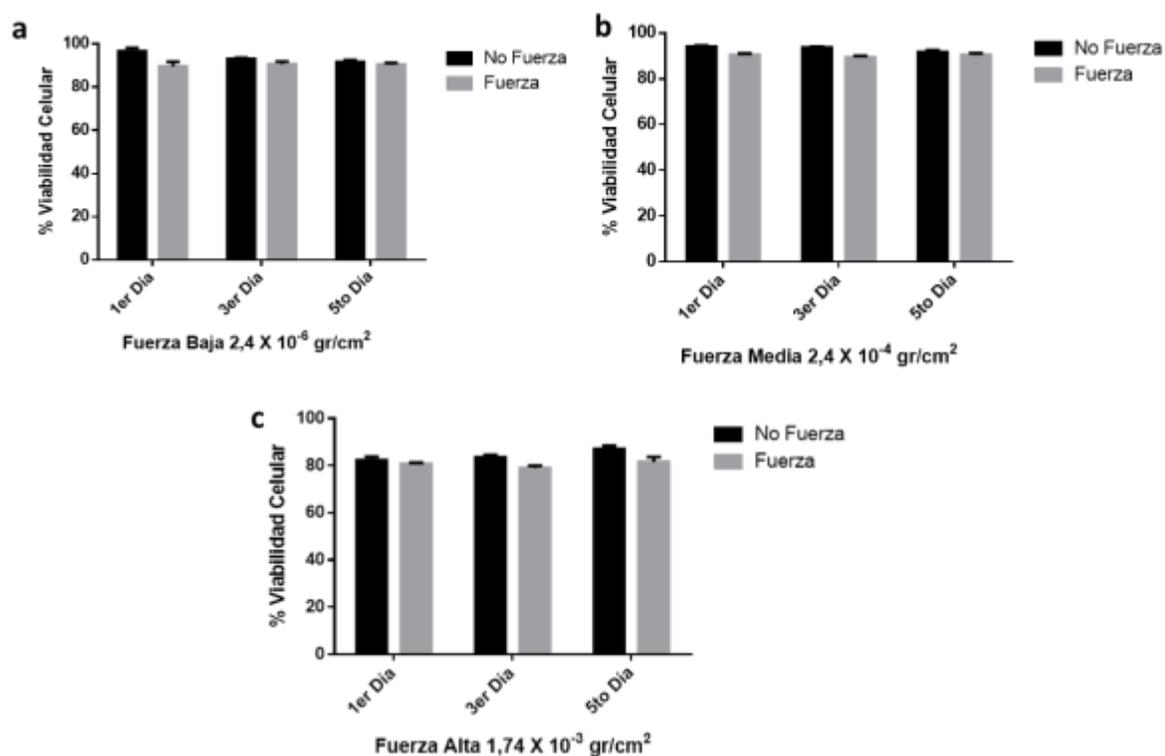
Cuando se compara el resultado obtenido al aplicar la fuerza respecto a las células de no fuerza, al tercer día se aumentó la actividad TRAP en los grupos con fuerza baja con un 30%, con media 37% y alta 44%. A los 5 días de aplicar la fuerza centrífuga, se evidenció un aumento de 30%, 33% y 55% con las diferentes fuerzas baja, media y alta. Según estos resultados, hay un aumento significativo en la actividad TRAP+ con respecto a los días de aplicación de la fuerza, en donde a mayor tiempo de aplicación de la fuerza, mayor es el número de células TRAP+, excepto en el grupo de fuerza media, en donde hubo una tendencia a disminuir este número al quinto día de aplicar la fuerza.

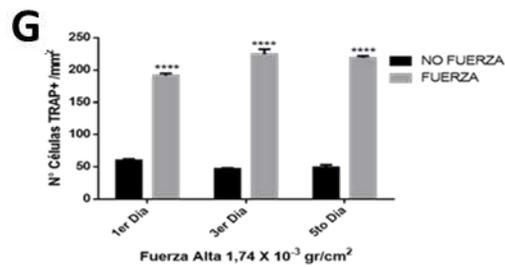
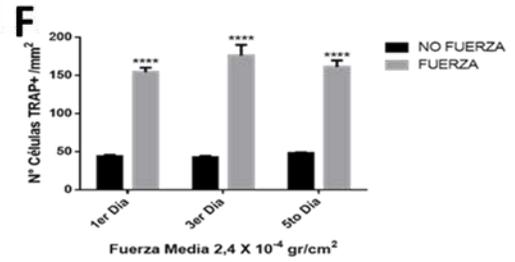
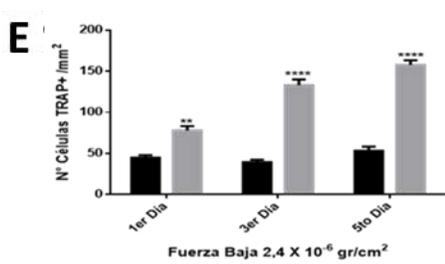
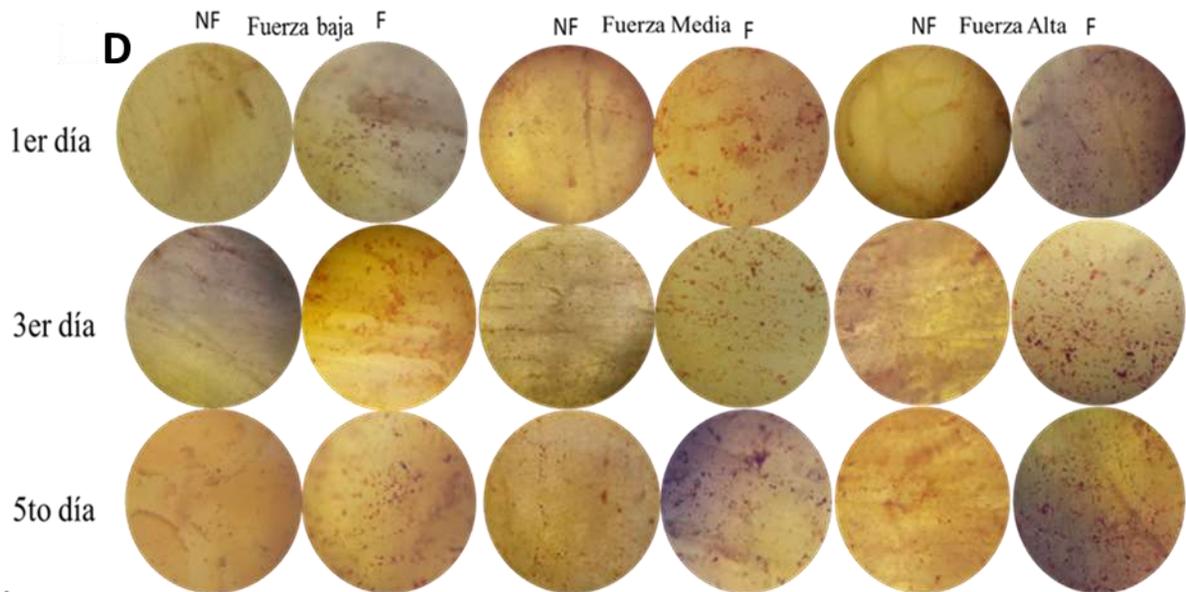
Al evaluar la actividad resorptiva de las células sujetas a fuerza centrífuga de diferentes velocidades, se observa que en el grupo control, al cual no se le aplicó fuerza, la lámina ósea fue homogénea con las características del hueso normal. Se evaluó todas las zonas del hueso y sin embargo no se observó ningún patrón de resorción ósea. Ahora bien, cuando se compara el grupo experimental (fuerza) con el control (no fuerza), se observó un porcentaje de resorción al primer día de aplicar la fuerza en los 3 diferentes grupos, con un 26, 32 y 35% respectivamente. Por otro lado, al tercer y quinto día de aplicar la fuerza los 3 grupos mostraron un aumento significativo de resorción, con un porcentaje de 33, 40 y 56% para la fuerza media, y 40, 44 y 52% para el alta.

Se observaron áreas de resorción ósea pequeñas en forma de áreas claras irregulares, en los 3 grupos a los cuáles se les aplicó fuerza. Igualmente se encontraron áreas con diámetro apenas visible, que aparenta ser similar al tamaño de una célula. Otras láminas óseas presentaron áreas de resorción de diámetro mediano, de forma redondeada, pero con bordes irregulares y otras de diámetro grande, debido a que es posible que en esas partes hubiera un gran acumulo de

células. Adicionalmente las áreas de resorción se encontraron en el centro de las láminas de hueso en una mayor cantidad.

Analizados los anteriores resultados, se tomó la fuerza media de 2.4×10^{-4} (30 r.p.m) como la ideal puesto que no hay grandes diferencias respecto a la fuerza alta y no forzamos el aparato con el que se aplica la fuerza. Igualmente, puesto que la fuerza media no mostró cambios significativos cuando se comparó el día 3 y 5, se escogió el tiempo de aplicación de la fuerza como tres días.





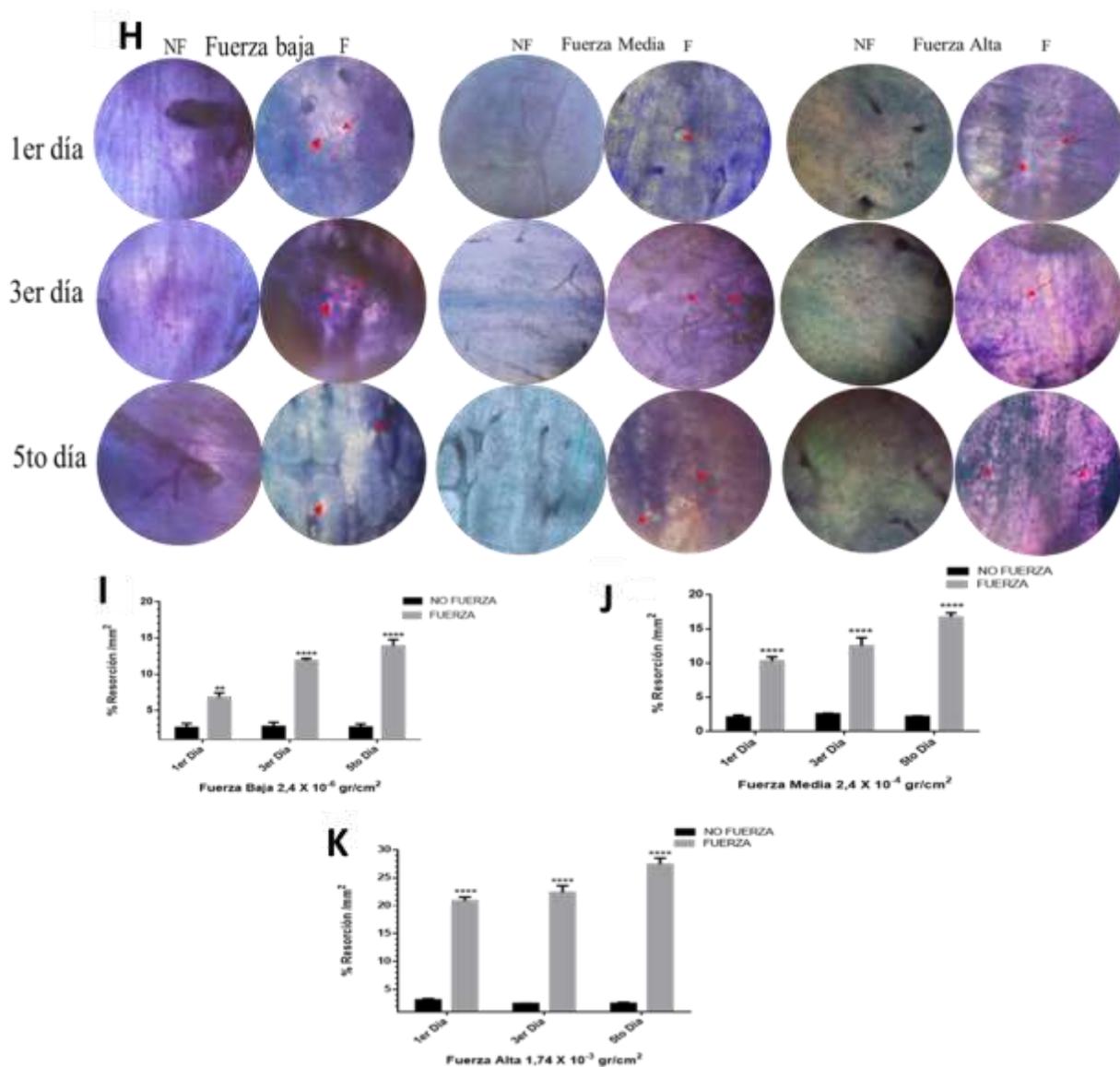


Figura 1. Viabilidad celular y actividad TRAP y resortiva de células U937 tratadas con diferentes velocidades de fuerza centrífuga de 2.4×10^{-6} ; 2.4×10^{-4} o $1.74 \times 10^{-3} \text{ gr/cm}^2$ (3, 30 u 80 r.p.m.) durante 1, 3 y 5 días de cultivo. NF= No fuerza, F= Fuerza. (A,B,C) Cuantificación de porcentaje de viabilidad celular (D-G) TRAP de láminas óseas representativas de células U937 tratadas con fuerza centrífuga. (H-K) Láminas representativas del número de lagunas de resorción. Los resultados se presentan como media \pm SEM (* $P < 0,05$). Los asteriscos indican diferencias

significativas con respecto a los controles de no fuerza. Todo se evaluó en un microscopio de luz. Objetivo 20x.

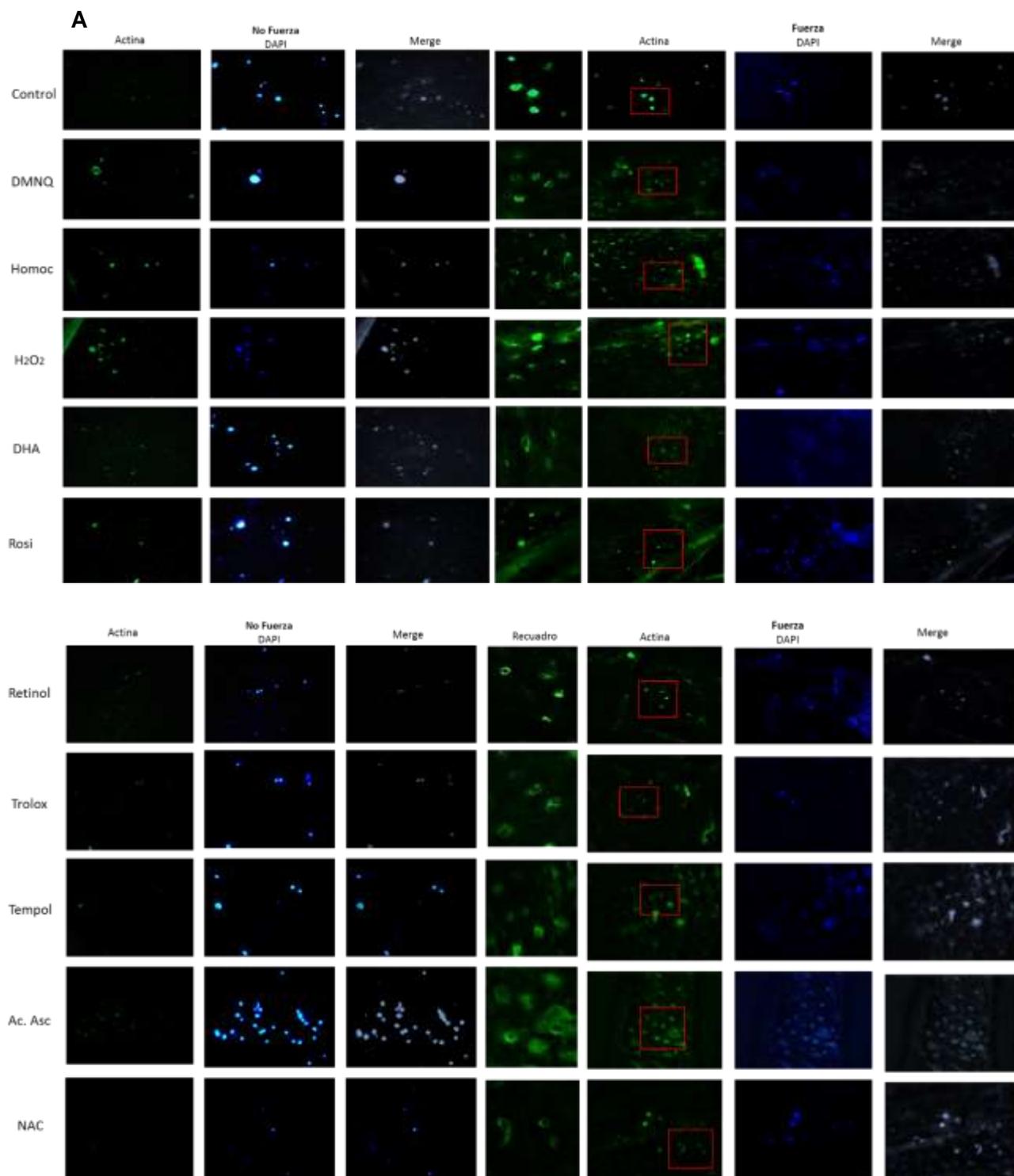
Formación de anillos de actina de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} (30 r.p.m) durante 3 días de cultivo, tratadas previamente con oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma.

Para precisar la presencia de anillos de actina, característica de los osteoclastos cuando están maduros, en células U937 tratadas previamente con oxidantes, antioxidantes, agonistas de PPAR gamma y fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} , se evaluó mediante inmunofluorescencia. Para esto las células se fijaron con paraformaldehído, se colocó anticuerpo primario contra actina y anticuerpo secundario con DAPI y Falloidina, y luego se observaron las láminas óseas en un microscopio de fluorescencia.

Cuando se compara el resultado obtenido al aplicar la fuerza junto con los reactivos, respecto a cuando se aplicó la fuerza sin reactivos, se aumenta un 25% con DMNQ, 20% con peróxido de hidrógeno y con homocisteína 15%. Cuando se aplican los agonistas de PPAR gamma, (retinol) se disminuye 25%, y con DHA y rosiglitazona no hay cambios significativos. Ahora bien, con respecto a los antioxidantes, se disminuye un 18 y 23% con trolox y tempol. Por otro lado, con ácido ascórbico no se evidencian cambios y disminuyó un 35% con NAC.

Cuando se compara el resultado obtenido cuando no se aplicó la fuerza sin reactivos, respecto a cuando no se aplicó la fuerza con reactivos encontramos que aumenta la formación de anillos de actina un 75%, 77% y 77% con los oxidantes DMNQ, homocisteína y peróxido de hidrógeno respectivamente. Con los agonistas de PPAR gamma, DHA aumentó un 67%, rosiglitazona un 69% y retinol se mantuvo igual. Con respecto a los antioxidantes no se observan cambios significativos.

Por otro lado, se encontró que en los grupos donde se evidenció la presencia de actina, ésta estaba distribuida en la mayoría de las células de forma homogénea y no polarizada, extendida por toda la célula.



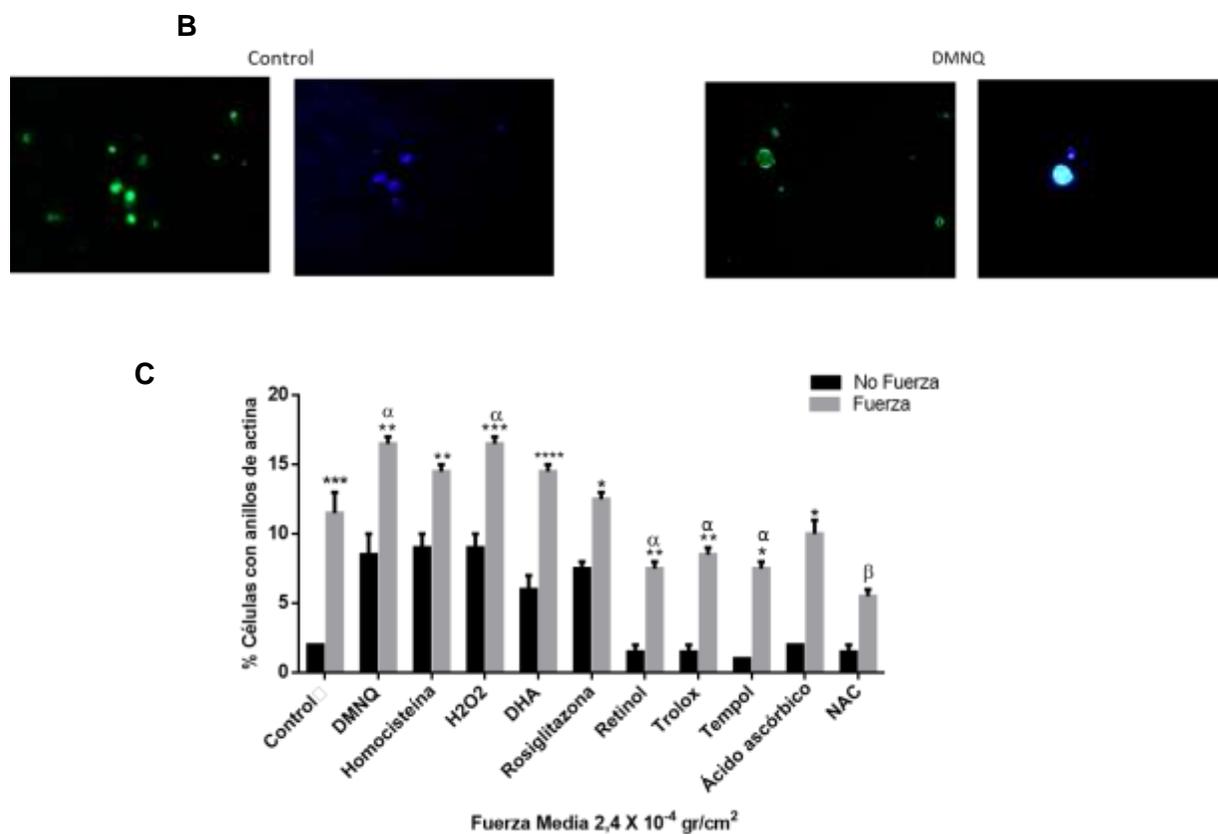


Figura 3. Formación de anillos de actina de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de $2,4 \times 10^{-4}$ durante 3 días y tratadas con oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma. A) Microfotografías representativas de inmunofluorescencia con anticuerpo contra actina (color verde), falloidina y DAPI (color azul para núcleos). B) Imágenes agrandadas de control y DMNQ con fuerza C) Cuantificación del porcentaje de células con anillos de actina. Oxidantes (DMNQ, Homocisteína, H₂O₂), antioxidantes (trolox, tempol, ácido ascórbico, NAC) y agonistas de PPAR gamma (DHA, Retinol, Rosiglitazona). Los resultados se presentan como media \pm SEM (*P<0,05). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los controles de no fuerza. α = * β = ** δ =*** ϵ =**** significancias con respecto al grupo de fuerza del control. Recuadros en rojo, imágenes ampliadas.

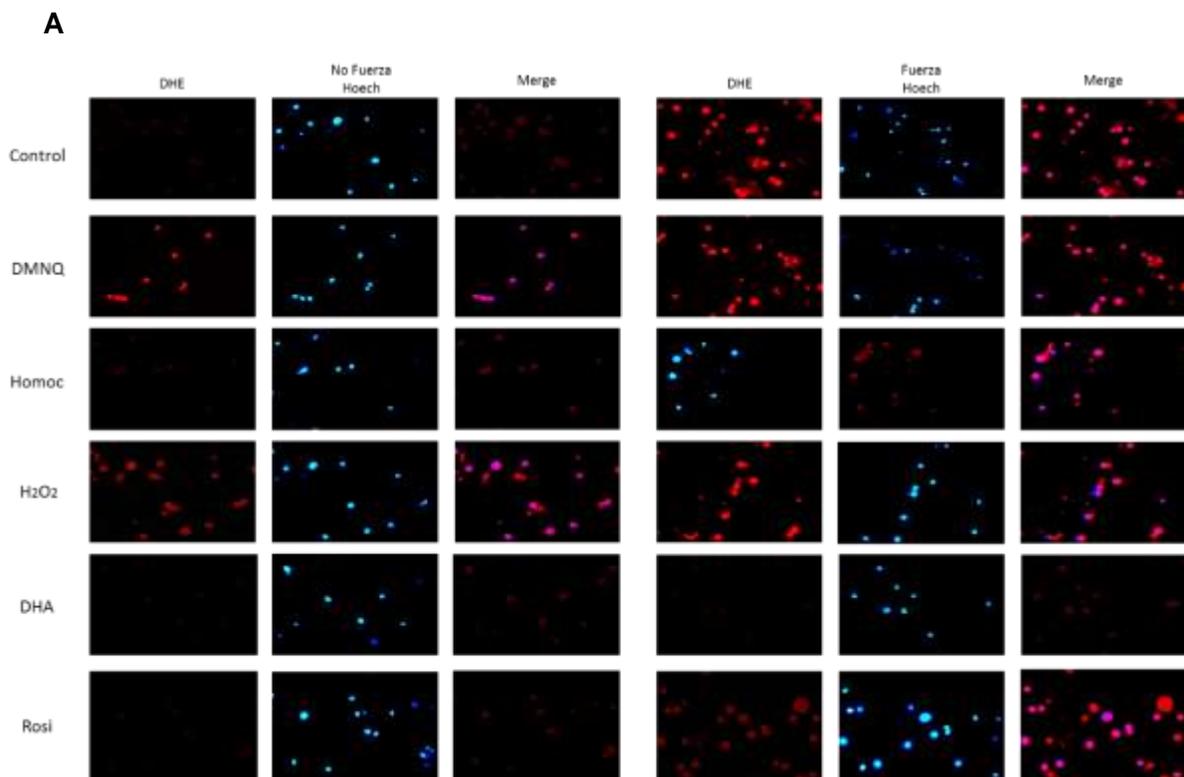
Viabilidad celular y expresión de especies reactivas de oxígeno (ROS) de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} durante 3 días de cultivo, tratadas previamente con oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma.

Para determinar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las láminas de hueso donde previamente se sembraron las células U937 sometidas a fuerza centrífuga durante 3 días y que fueron tratadas con agentes oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma, se aplicó dihidroetidio (DHE) junto con hoechst, se evaluaron en un microscopio de fluorescencia y se analizó la intensidad de fluorescencia corregida.

Cuando se compara el resultado obtenido al aplicar la fuerza junto con los reactivos, respecto a cuando se aplicó la fuerza sin reactivos, encontramos que de los oxidantes el DMNQ aumenta un 18% y el peróxido 16%, la homocisteína se mantiene sin diferencias significativas. Con los agonistas de PPAR gamma, el DHA disminuye un 69%, rosiglitazona un 34% y retinol 67%. Los antioxidantes disminuyeron, trolox 62%, tempol 67%, ácido ascórbico 66% y NAC 72%, siendo mayor la disminución con este último.

Cuando se compara el resultado obtenido cuando no se aplicó fuerza ni reactivos, respecto a cuando no se aplicó fuerza encontramos que los oxidantes DMNQ aumentó un 76%, homocisteína y peróxido de hidrógeno no demuestra cambios significativos. Con respecto a los agonistas de PPAR gamma y a los antioxidantes no hay cambios significativos, excepto con NAC en donde su expresión es casi nula.

A las 24, 48 (dato no mostrado) y 72 horas de cultivo fig. 5c, se realizó viabilidad celular con azul de tripan y se evidenció que cuando se aplica la fuerza centrífuga hay una tendencia a disminuir la viabilidad celular de un 95 a 85%, sin embargo, no es un dato significativo.



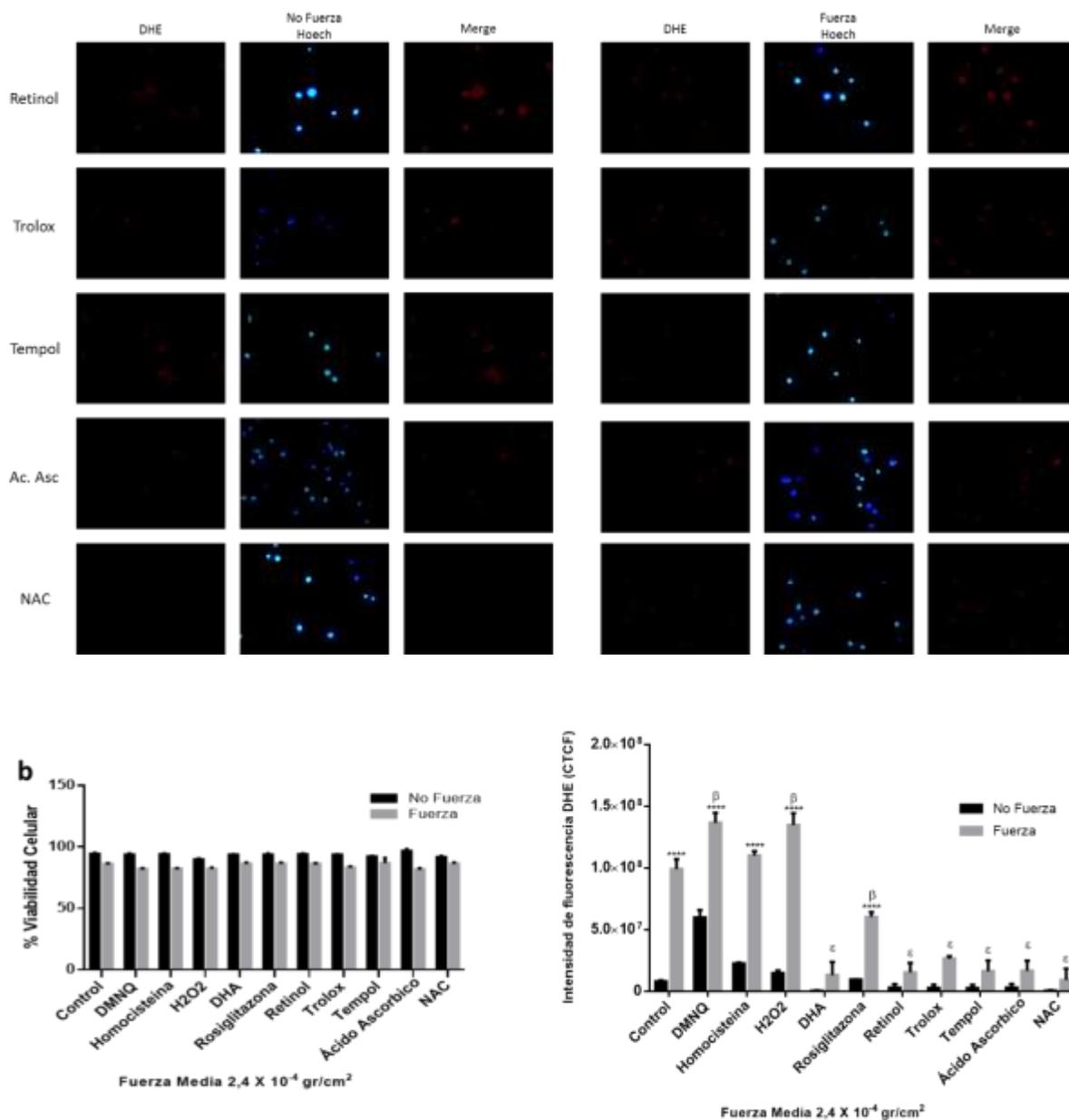


Figura 4. Viabilidad celular y expresión de especies reactivas de oxígeno de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} a) Microfotografías representativas de inmunofluorescencia con Dihidroetidio (DHE). b) Porcentaje de viabilidad celular a las 72 horas, luego de tratar células U937 con fuerza centrífuga y oxidantes (DMNQ, Homocisteína, H₂O₂), antioxidantes (trolox, tempol, Ac. Ascórbico, NAC) y agonistas de PPAR gamma (retinol, DHA, Rosiglitazona). c) Intensidad de fluorescencia de DHE. Los resultados se presentan como media \pm

SEM (* $P < 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los controles de no fuerza. $\alpha = *$ $\beta = **$ $\delta = ***$ $\varepsilon = ****$ significancias con respecto al grupo de fuerza del control. CTCF: Fluorescencia celular total corregida.

Actividad TRAP y resortiva de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} durante 3 días de cultivo, tratadas previamente con oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma.

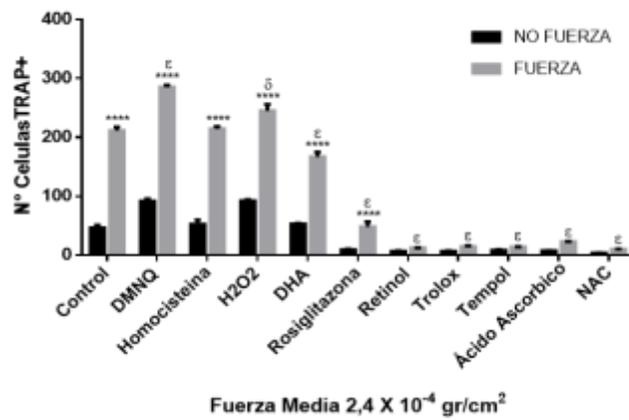
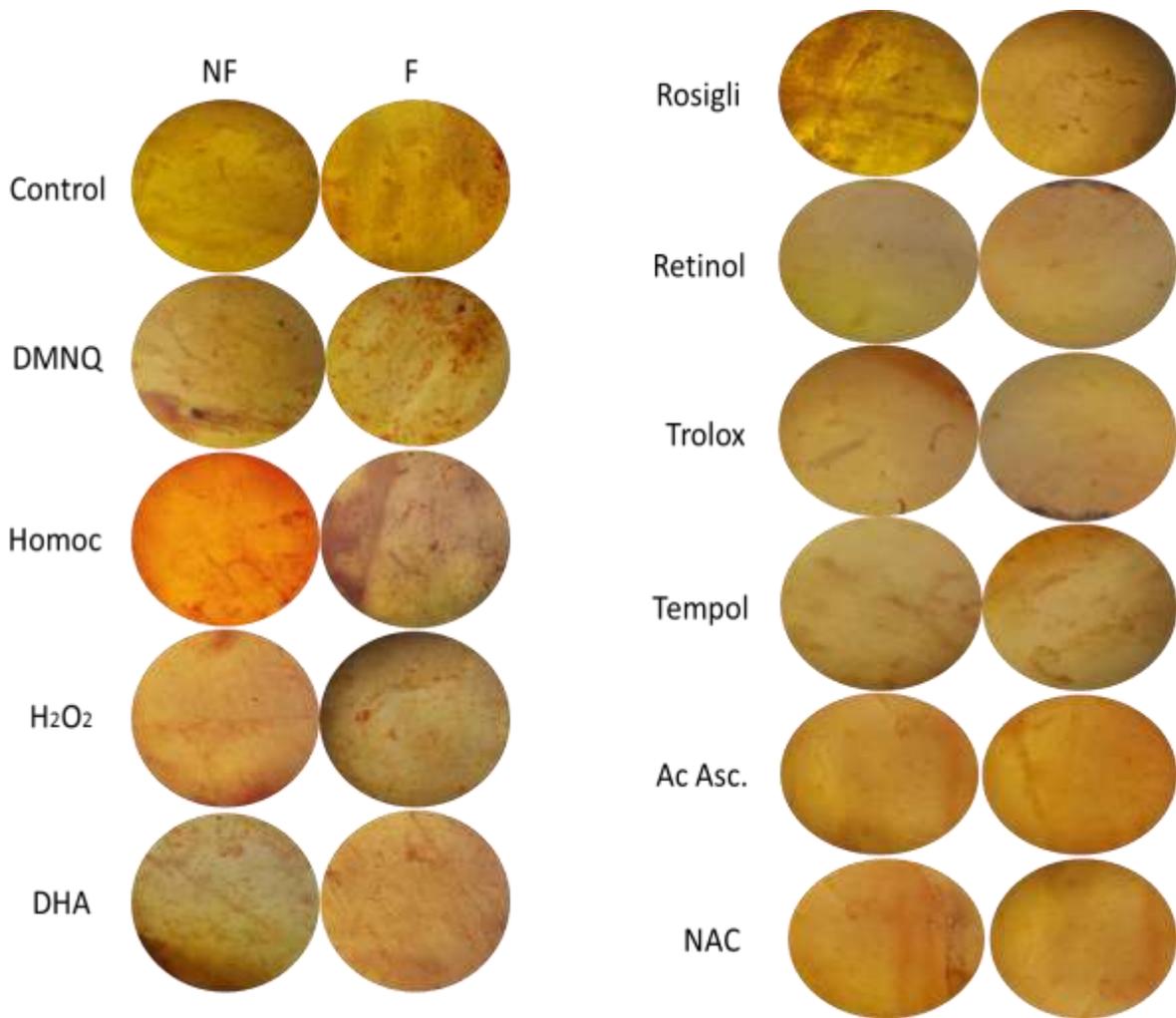
Luego del tercer día de cultivo, las células U937 anteriormente sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} (30 r.p.m) y tratadas con los reactivos correspondientes, fueron teñidas con tinción para TRAP. Se encontró que para los oxidantes junto con fuerza comparados a la fuerza sola, hubo un aumento significativo alto en el número de células TRAP+ cuando se aplicó fuerza con valores de 22% con DMNQ, 19% con peróxido de hidrógeno y no hubo cambios significativos con homocisteína. Por otro lado, los agonistas de PPAR gamma, disminuyeron significativamente con un 12%, 59% y 70% con DHA, rosiglitazona y retinol respectivamente. Los antioxidantes disminuyeron 71%, 70%, 68% y 72% con trolox, tempol, ácido ascórbico y NAC.

Ahora bien, cuando se compara con las células a las que no se les aplicó la fuerza sin reactivos con las de no fuerza con reactivos, el DMNQ y el peróxido de hidrógeno aumentaron significativamente con un 12% y 11% y la homocisteína no presenta cambios. Contrariamente, los agonistas de PPAR gamma DHA se

mantiene, rosiglitazona disminuye 34% y retinol 43%. Por otro lado, los antioxidantes mostraron una disminución significativa importante de 56, 55, 54 y 57% correspondiendo a trolox, tempol, ácido ascórbico y NAC respectivamente.

Posteriormente las láminas óseas se tiñeron con azul de Tollouidina para evaluar el porcentaje de lagunas de resorción y cuando se comparan los grupos a los que se les realizó fuerza junto con adición de reactivos respecto a el grupo de fuerza sin reactivos, se observó que los oxidantes aumentaron significativamente con porcentajes de 54% DMNQ, 46% homocisteína y 48% peróxido de hidrógeno, con respecto a los agonistas de PPAR gamma, DHA se mantuvo; por otro lado, rosiglitazona y retinol mostraron un menor porcentaje de lagunas de resorción disminuyendo 21% y 24% respectivamente. Por otro lado, los antioxidantes trolox, tempol, ácido ascórbico y NAC disminuyeron 23%, 24%, 22% y 26% respectivamente.

Cuando se compara con las células a las que no se les aplicó la fuerza sin reactivos, respecto al grupo de no fuerza sin reactivos observamos que los tres oxidantes mostraron un aumento significativo, DMNQ 84%, homocisteína 81% y peróxido de hidrógeno 79%. Los agonistas de PPAR gamma, DHA aumentó 65%, rosiglitazona y retinol se mantuvieron. Por otro lado el uso de los antioxidantes no mostro diferencias significativas a pesar de que hubiera una tendencia a disminuir el porcentaje de resorción.



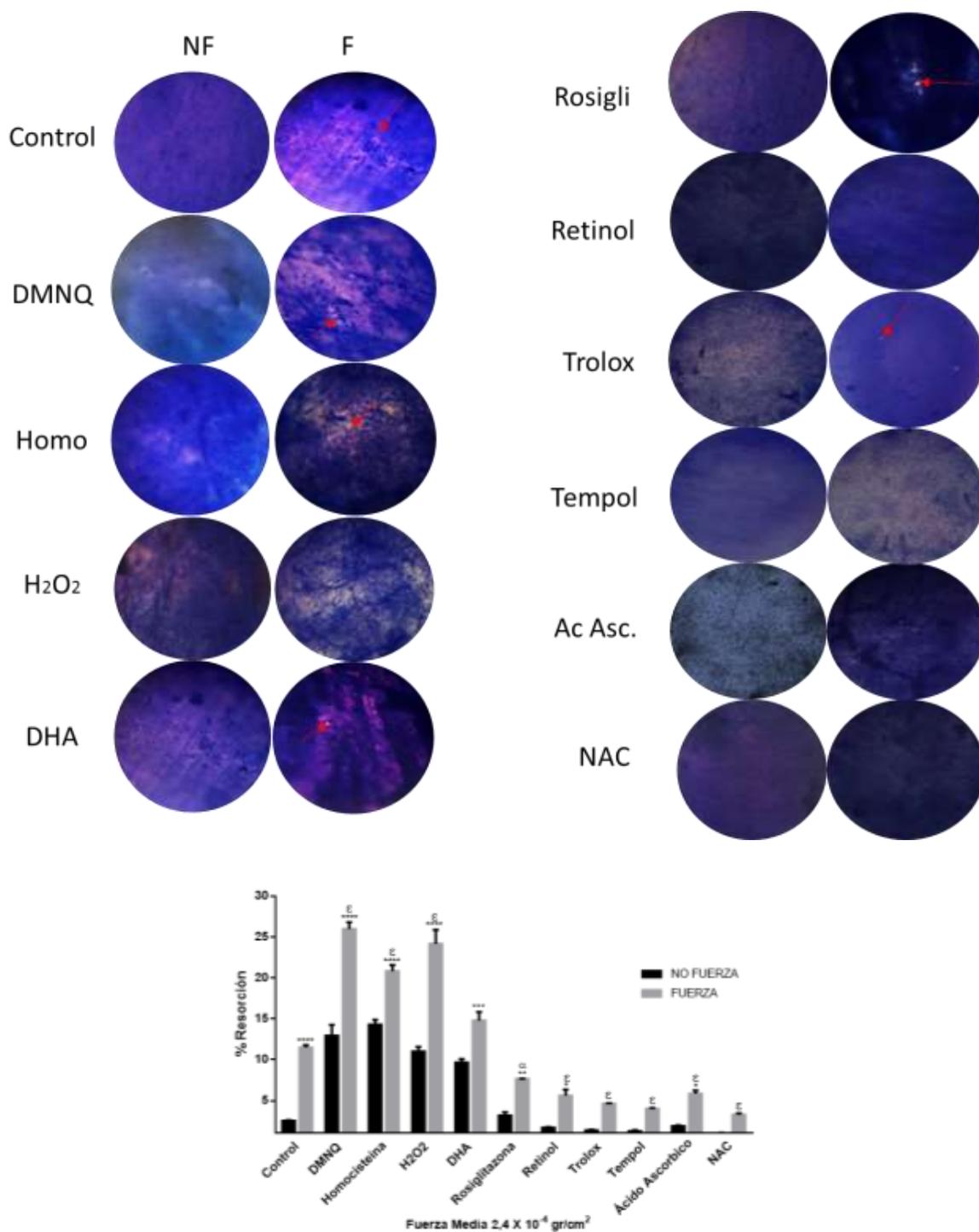


Figura 5. Actividad TRAP y resortiva de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} (30 r.p.m.) a) Microfotografías representativas de tinción TRAP c) Azul de toluidina, resorción. b) Cuantificación de células TRAP+, luego de tratar células

U937 con fuerza centrífuga y oxidantes (DMNQ, homocisteína, H₂O₂), antioxidantes (Retinol, trolox, tempol, Ac. Ascórbico, NAC) y agonistas de PPAR gamma (DHA, Rosiglitazona). d) Cuantificación del porcentaje de resorción. Los resultados se presentan como media \pm SEM (*P<0,05). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los controles de no fuerza. $\alpha=$ * $\beta=$ ** $\delta=$ *** $\epsilon=$ **** significancias con respecto al grupo de fuerza del control. CTCF: Fluorescencia celular total corregida.

Evaluación mediante inmunofluorescencia de la expresión de marcadores osteoclasticos en células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} (30 r.p.m) durante 3 días de cultivo junto con la aplicación del oxidante (DMNQ) y antioxidante (NAC).

Para analizar los marcadores osteoclasticos, las células U937 se sembraron sobre láminas de hueso cortical bovino y se mantuvo en cultivo durante 3 días con o sin fuerza centrífuga. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos primarios policlonales específicos de fusión (OC-STAM, DC-DTAMP, Sinc-1, ADAM-12, CD-47) y de actividad osteoclastica (CTSK, MMP9, V-ATPasa) y de diferenciación osteoclastica (PPAR γ , NF- κ B, NFATc1).

Se observó que casi todos los controles de no fuerza, fueron negativos para fluorescencia (OC-STAMP, DC-STAMP, Sinc-1, CD-47, ADAM-12 y PPAR-gamma). Sin embargo, las láminas de los marcadores CTSK, MMP-9 y vATPasa, correspondientes a actividad resortiva, mostraron fluorescencia del 6, 5 y 7% respectivamente. Además, NF- κ B y NFATc1 mostraron una alta intensidad de fluorescencia, 25% y 20% respectivamente.

Ahora bien, los grupos experimentales tratados con fuerza centrífuga correspondientes a NF- κ B, NFATc1, PPAR-gamma, vATPasa, CTSK y MMP-9 y CD-47 mostraron un aumento significativo alto, comparado con los controles (no fuerza), ver porcentajes en tabla 5. Sin embargo, los marcadores de fusión osteoclastica (DC-STAMP, OC-STAMP, Sincitina-1 y ADAM-12) no mostraron una intensidad de fluorescencia importante, excepto CD-47. Adicionalmente, se observó grupos celulares pequeños definidos, del tamaño de una célula y positivos

para los marcadores correspondientes a diferenciación NF- κ B, NFATc1, PPAR-gamma y actividad CTSK, MMP-9 y vATPasa.

Marcador	No Fuerza	Fuerza
OC-STAMP	Negativo	4%
DC-STAMP	Negativo	4%
Sinc-1	Negativo	3%
CD-47	Negativo	32%
ADAM-12	Negativo	4%
CTSK	6%	42%
MMP9	7%	50%
V-ATPasa	5%	25%
NFkb	25%	60%
NFATc1	20%	40%
PPAR gamma	Negativo	34%

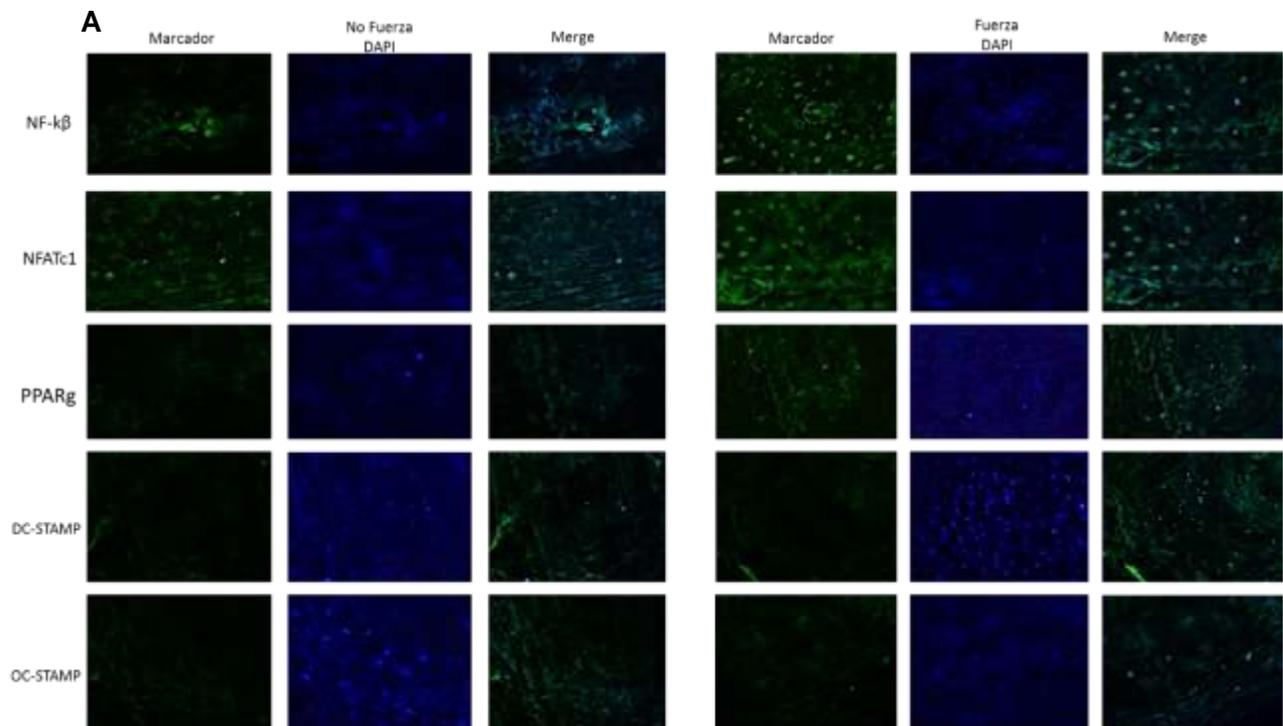
Tabla 5. Porcentaje de intensidad de fluorescencia de marcadores osteoclasticos, de fusión (OC-STAMP, DC-STAMP, Sinc-1, CD-47 y ADAM-12) de actividad resortiva (CTSK, MMP9, V-ATPSasa), y de diferenciación (NF- κ B, NFATc1, PPAR gamma) de células U937 tratadas con fuerza centrífuga de 2.4×10^{-4} (30 r.p.m), durante 3 días de cultivo.

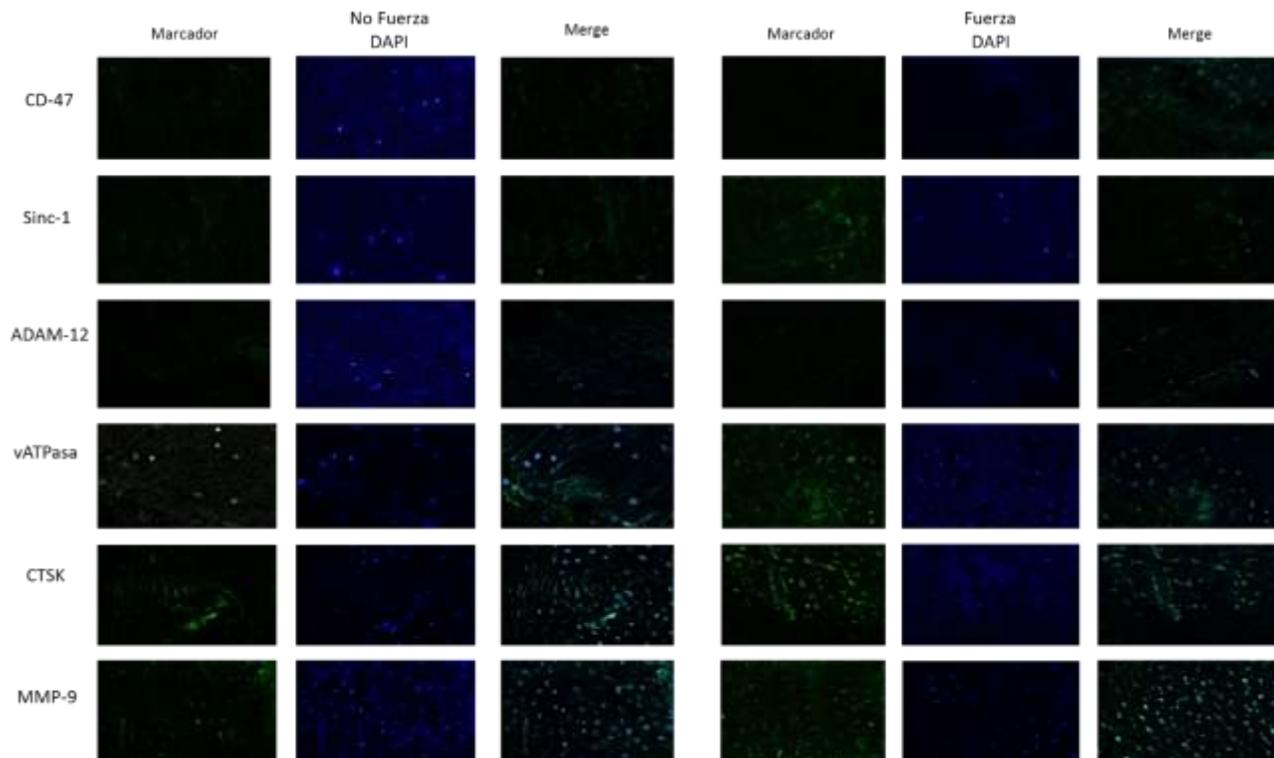
La evaluación de la expresión de los marcadores osteoclasticos cuando se aplica fuerza junto con la adición del oxidante DMNQ, que el fue el que aumentó la actividad TRAP y resortiva en mayor porcentaje, cuando se compara con el grupo de fuerza sin reactivos, se encontró que aumenta de manera significativa la

expresión de los marcadores de NF- κ B 82%, NFATc1 73%, PPAR-gamma 64%, CD-47- 37%, vATPasa 53%, CTSK 56% y MMP-9-54%.

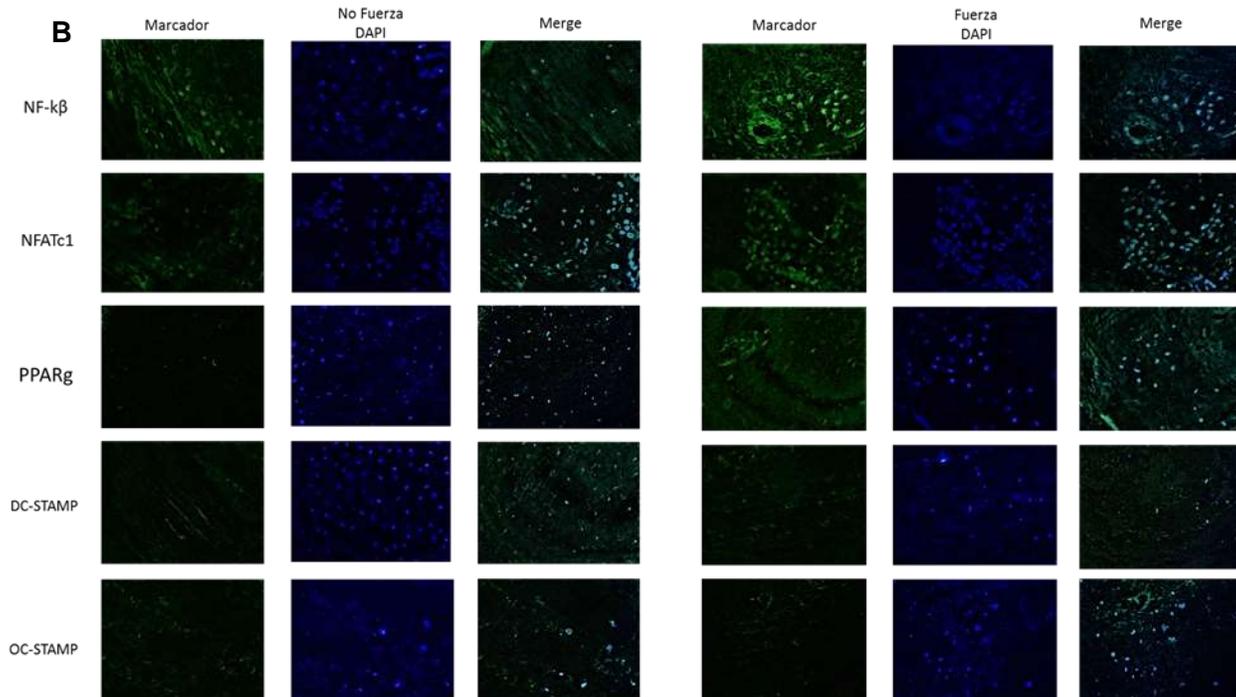
Posteriormente se observó la expresión de marcadores cuando se aplicó la fuerza junto con el antioxidante que más disminuyó la actividad TRAP y resortiva, NAC; y se encontró que hubo una disminución significativa cuando se compara con el grupo de fuerza sin reactivos, la expresión de marcadores correspondientes a diferenciación mostraron una reducción, NF- κ B del 91%, NFATc1 86% y PPAR-gamma 68%. Con respecto a los marcadores de actividad resortiva se observó que disminuyeron, vATPasa 72%, MMP9 88% y CTSK 83%. Además, no hay diferencias significativas en la expresión de marcadores de fusión celular (OC-STAMP, DC-STAMP, Sinc-1, CD-47 y ADAM-12). En la gráfica se observa la expresión casi nula de los marcadores con NAC, por lo que los valores son muy bajos comparados con los demás de fuerza sola y fuerza + DMNQ.

Marcadores osteoclasticos de células U937 sometidas a fuerza centrífuga por 3 días





Marcadores osteoclasticos de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 30 r.p.m durante 3 días y tratadas con DMNQ.



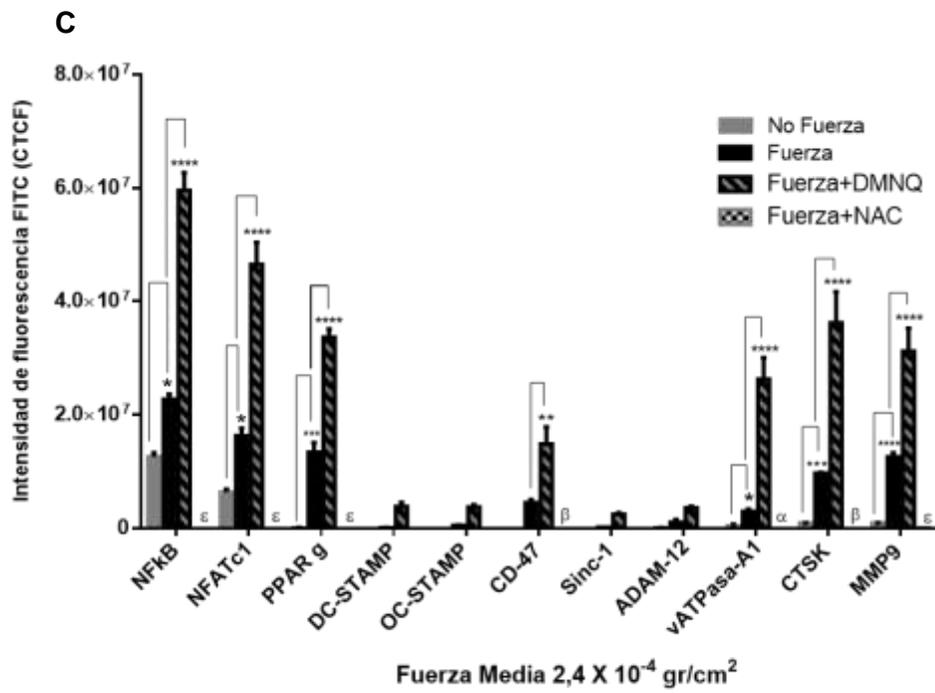
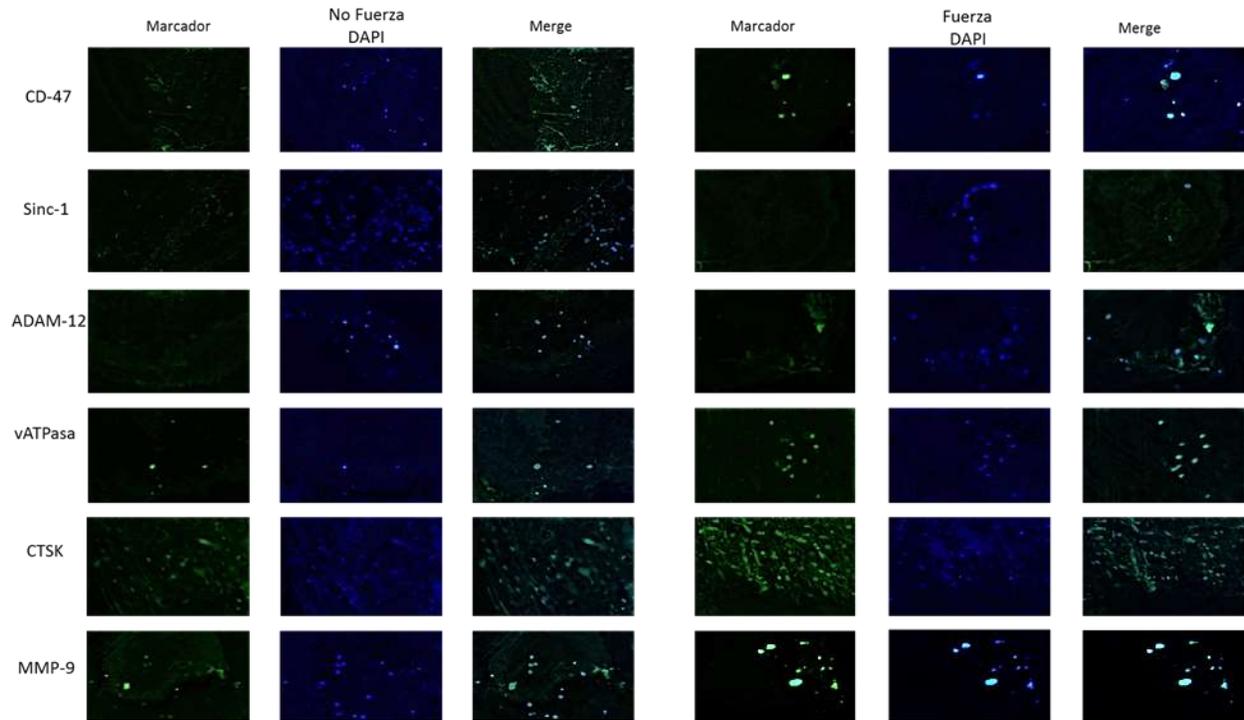


Figura 6. Intensidad de fluorescencia de marcadores osteoclasticos de células U937 sometidas a fuerza centrífuga junto con la adición del oxidante (DMNQ) y antioxidante (NAC). a) Microfotografías representativas de inmunofluorescencia de anticuerpos policlonales (marcadores osteoclasticos), de células U937 tratadas o no con fuerza centrífuga durante 3 días. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI y anticuerpos como se describió en materiales y métodos, evaluados al Microscopio de fluorescencia, observadas con objetivo de 40x. B) Microfotografías representativas de marcadores osteoclasticos cuando se adiciona DMNQ C) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de marcadores osteoclasticos solo con fuerza, con DMNQ y NAC. Los resultados se presentan como media \pm SEM (* $P < 0,05$). Los asteriscos indican diferencias significativas. $\alpha = *$ $\beta = **$ $\delta = ***$ $\epsilon = ****$ indican las significancias de Fuerza+NAC con respecto al grupo de control de fuerza sin tratamiento. CTCF: Fluorescencia celular total corregida.

DISCUSIÓN

La actividad osteoclástica se puede modificar de acuerdo a cambios en los estímulos ambientales, como el estímulo mecánico, que da como resultado un aumento en la activación de cascadas de señalización implicadas en la proliferación, diferenciación y actividad del osteoclasto. Entre otras cosas se ha evidenciado que un ambiente oxidante promueve la diferenciación y actividad del osteoclasto y que la presencia de agonistas de PPAR gamma influye ya sea aumentando o disminuyendo en la osteoclastogénesis⁹⁰⁻⁹¹. Sin embargo, no se ha determinado si el estrés celular origina una actividad oxidativa celular que induzca actividad resortiva similar a la del osteoclasto o si dicha actividad es independiente del estrés oxidativo. Por esto, el objetivo de este estudio fue analizar los cambios característicos de actividad osteoclástica de células U937 sometidas a fuerza centrífuga y tratadas con agentes oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR γ . Buscamos comprender si la actividad similar a la realizada por el osteoclasto está relacionada con eventos bioquímicos generados por el estrés de la fuerza centrífuga y si dicho estrés induce en la célula un estado oxidativo. Es decir, si obligatoriamente la célula genera actividad oxidativa, independientemente de la causa, como requisito para la actividad resortiva y si dicha actividad se altera al tratar las células sometidas a la fuerza centrífuga, con agentes oxidantes, antioxidantes o agonistas de PPAR γ . Este modelo ha sido usado en el laboratorio de virus de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y abre el campo para estudiar e investigar este mismo efecto sobre el osteoblasto y sobre otros tipos de células, relacionadas con el metabolismo óseo.

En nuestro trabajo, se observó que las células sometidas a diferentes aceleraciones, dependiendo del radio al cual se encontraban ubicadas, presentaban diferente respuesta. Las que se encontraban unas más lejos del centro del rotor ($RCF = 1,12 \times R \times (RPM/1000)^2$ (ver anexos), presentaban mayor respuesta similar a osteoclasto. Esto ocurre porque se indujo una fuerza mayor a

las células sembradas más lejos del centro del rotor, a medida que se aleja el objeto del punto central donde se aplica la fuerza, mayor es la fuerza aplicada. Por ejemplo, hay un aumento en la actividad TRAP y resortiva de las células a medida que se aplica una mayor fuerza (presión) en un mayor tiempo, figura 1. Esto sugiere que las células U937 responden a la fuerza centrífuga de forma heterogénea ya que varía dependiendo de la magnitud y aceleración de la fuerza ejercida.

Se conoce que la actividad resortiva es llevada a cabo por los osteoclastos diferenciados y que durante el proceso de diferenciación la célula requiere una actividad bioquímica oxidativa y la represión de proteínas y genes implicados en actividad reductora. Buscamos si en nuestro modelo ocurría lo mismo y se observó que la fuerza aumentó la expresión de especies reactivas de oxígeno (Fig 3), sugiriendo que la fuerza centrífuga, induce estrés bioquímico incluyendo un estado oxidativo. Podemos especular que la fuerza puede generar estrés oxidativo y, como en el osteoclasto, probablemente actúa por medio de la activación y traslocación al núcleo de NF- κ B, como lo han sugerido¹³⁸. En nuestro trabajo, al aplicar la fuerza centrífuga se aumentó la expresión de NF- κ B respecto al control y el aumento se acentuó al aplicar la fuerza mas el reactivo prooxidante DMNQ. En cambio, al tratar células U937 con fuerza y antioxidantes como N-acetil cisteína, se encontró una expresión casi nula de NF- κ B y NFATc1 cuando se compara con el control de fuerza solo. De igual forma, el aplicar la fuerza sola o junto con la adición de oxidantes como DMNQ y peróxido se aumentó la expresión de ROS, y cuando se adicionaron antioxidantes hubo una disminución importante (Fig 6). Estos resultados sugieren que en células mononucleares, sometidas a estrés, se generan cambios bioquímicos similares a lo que ocurre en el osteoclasto, como la actividad oxidativa.

En el osteoclasto maduro la formación de anillos de actina la emplea para formar el cinturón de podosoma en la zona de sellado, conformada por el borde en cepillo. Esto permite la adherencia al hueso y empezar la degradación de matriz ósea tanto orgánica como inorgánica. En este trabajo, evaluamos la expresión del porcentaje de anillos de actina de las células sometidas a fuerza centrífuga con la aplicación previa de oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma (Fig 2). Se observó

que la fuerza incrementó el porcentaje de anillos de actina y esto se potenció al aplicar los oxidantes. Al contrario, cuando se adicionaron antioxidantes hubo una disminución en la presencia de anillos de actina comparado con el grupo de fuerza del control. Estos resultados apoyan lo señalado anteriormente: las células mononucleares, sometidas a estrés, generan cambios bioquímicos similares a lo que ocurre en el osteoclasto, como la actividad oxidativa y la formación de anillos de actina.

Por otro lado, es importante resaltar que no hubo expresión de marcadores de fusión celular cuando se aplicó la fuerza, excepto para CD-47, el cual se ha reportado que está presente en células mononucleares y actúa en etapas tempranas de fusión, y no se encuentra en gran cantidad en células fusionadas o multinucleadas⁵⁴. Esto sugiere que la fuerza o estímulo mecánico no está implicado en inducir procesos de fusión celular.

En diversos estudios se ha visto que el agonista de PPAR gamma, DHA, tiene un papel antirresortivo en el osteoclasto al inhibir o disminuir la expresión de factores osteoclastogénicos como NF- κ B, uniéndose a la subunidad p65 del mismo impidiendo su activación⁹⁰⁻¹⁴⁰ o también puede realizar la función contraria induciendo un aumento en la expresión de proteínas implicadas en la osteoclastogénesis como lo es c-Fos⁹¹.

En nuestra investigación observamos que al usar DHA a una concentración de 40 μ M junto con fuerza centrífuga en células U937 hay una disminución en la producción de ROS. DHA es un ácido graso poliinsaturado, con potencial bioquímico para generar ROS. Sin embargo, al unirse a PPAR gamma puede inhibir la traslocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B, y disminuir la generación de ROS. Se conoce que NF- κ B es inductor de ROS⁹⁰. En un estudio del año 2017¹⁴³ se observó que en células pancreáticas el DHA tuvo un efecto antioxidante al disminuir la producción de ROS, a una concentración de 20 a 50 μ M, que se relacionó con la inhibición de la vía JAK2/STAT3, esta acción antioxidante se atribuyó a una sobrerregulación de la expresión de enzimas antioxidantes como catalasa, glutatión peroxidasa y SOD2¹⁴³. La acción como

antioxidante del DHA no se ha estudiado en osteoclastos, ni en nuestro modelo. Sin embargo, en nuestro trabajo el DHA aumentó la actividad resortiva en células sin aplicar fuerza centrífuga respecto a las mismas células sin DHA y la actividad resortiva aumento un poco más cuando se aplicó DHA junto con la fuerza centrífuga. Este resultado es contradictorio a la luz del conocimiento actual y no lo podemos explicar de manera coherente, puesto que hay suficientes evidencias que señalan la relación directa entre aumento de ROS y actividad resortiva. Especulando, podemos decir que la unión del DHA a PPAR gamma puede inhibir la traslocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B, y disminuir la generación de ROS, pero en células adheridas a hueso el DHA unido a PPAR gamma es inductor de actividad resortiva. En condiciones de estrés dicha unión no impide la unión a la subunidad p65 de NF- κ B, pero adicionalmente potencia la acción proresortiva que tiene PPAR gamma. Aun no se conoce bien el papel de PPAR gamma en la actividad osteoclastogénica. Se ha reportado que al hacer delección de PPAR gamma en ratones, se genera un patrón osteopetrotico debido a una inhibición en la osteoclastogénesis por medio de c-Fos un factor que se encuentra por una vía independiente a la de NF- κ B, cuya activación induce la inducción y traslocación al núcleo de NFATc1 para inducir la osteoclastogénesis¹⁴⁴. Otro estudio, realizado en precursores monocito/macrófago derivados de la médula ósea, tratados con DHA a concentraciones de 1, 5 y 10 μ M, encontraron un aumento en el número de osteoclastos TRAP + de manera dependiente de la concentración. Este aumento de osteoclastos TRAP+ coincidió con un aumento significativo de mRNA y proteína c-Fos y al aumento en la proteína NFATc1¹⁴⁵. En células humanas de cáncer gástrico, adicionando 150 μ mol/L de DHA, encontraron mediante western blot que se inducía la activación de ERK, JNK y AP.1 factores implicados en la activación e inducción de c-Fos¹⁴⁶. De acuerdo con esto, podemos especular que PPAR gamma de manera independiente de ROS y NF- κ B, podría inducir la actividad resortiva.

Se conoce que all-trans ácido retinoico, el reactivo utilizado en este trabajo, entra al núcleo por medio de la proteína de unión de ácido retinoico CRABP, e interactúa

con el receptor del ácido retinoico (RAR) y con el receptor retinoico X (RXR) los cuales regulan la expresión genética por medio de la formación de un heterodímero con los factores de transcripción LXR, PPAR gamma, entre otros¹⁴⁰. Estudios previos demuestran que los retinoides tienen efectos inhibitorios en la osteoclastogénesis¹⁴¹⁻¹⁴². En este trabajo encontramos que al aplicar all-trans ácido retinoico, junto con la fuerza centrífuga, disminuyen la formación de anillos de actina, la producción de ROS y la actividad TRAP y resortiva. Este hallazgo es parcialmente contradictorio con el anterior resultado en el cual DHA, el lignado de PPAR gamma, disminuye ROS, pero aumenta la resorción. Igualmente, estos resultados aparentemente contradictorios no lo podemos explicar de manera coherente a la luz del conocimiento actual. Especulando, podemos decir que al entrar al núcleo all-trans ácido retinoico, reprime de manera directa o indirecta genes relacionados con la actividad resortiva, probablemente de manera independiente a PPAR gamma. Si esto es cierto, implicaría que, tanto en el osteoclasto como en células mononucleares adheridas a hueso o sometidas a estrés oxidativo, PPAR gamma tiene actividades independientes, es decir, la actividad en citoplasma no siempre implica actividad nuclear. De tal forma que puede inhibir NF- κ B, induciendo disminución de ROS, pero no entrando al núcleo y en su lugar podría inducir la actividad resortiva. Esta especulación, requiere realizar experimentos que permitan afirmar o descartarla. Es probable que PPAR gamma y all-trans ácido retinoico, realicen funciones diferentes en el osteoclasto o en células con actividad similar al osteoclasto, a las realizadas en otras células como los preadipositos, adipositos, hepatocitos, etc., en donde PPAR gamma tiene una acción dual: en el citosol inhibiendo a la traslocación al núcleo de la subunidad p65 de NF- κ B y en el núcleo interactuando con el receptor del ácido retinoico (RAR) y con el receptor retinoico X (RXR) los cuales regulan la expresión genética por medio de la formación de un heterodímero que se une al DNA¹⁴⁰.

En la literatura también se evidencia esta aparente contradicción, por ejemplo, en un estudio adicionando un agonista de PPAR gamma (KR6277) junto con rosiglitazona a células mononucleares de médula ósea, disminuyó la diferenciación osteoclástica y la actividad, inhibiendo la vía de las MPKs y NF- κ B¹⁴⁷. En otro

estudio, utilizando el agonista sintético de PPAR-gamma (MSDC-0602) junto con rosiglitazona, encontraron un efecto pro-osteoclastogénico¹⁴⁸. Al parecer, el efecto de los agonistas de PPAR-gamma varía dependiendo de la afinidad de los mismos hacia este receptor, lo que indica que PPAR-gamma en los osteoclastos puede tener un efecto farmacológico dependiendo de su ligando.

CONCLUSION.

Someter células U937 a fuerza centrífuga de diferentes magnitudes y diferente tiempo de exposición, induce la generación de ROS y de anillos de actina, aumenta la actividad TRAP+ y resortiva. Es decir, someter células U937 individualizadas a estrés celular por fuerza centrífuga se induce actividad oxidativa, permitiendo inducir en estas células una actividad similar a la observada en osteoclastos, que son células multinucleadas. Dicha característica se acentúa al aplicar reactivos oxidantes y disminuye con antioxidantes, sugiriendo que el estado oxido-reductor de la célula es determinante en la actividad osteoclastogénica.

APORTES AL CONOCIMIENTO

I. Hace aportes originales, relacionados con el tema, estableciendo que células U937 individualizadas (no fusionadas) sometidas a fuerza centrífuga, inducen la generación de ROS y al aplicar reactivos inductores de oxidación aumenta la actividad osteoclastogénica y al aplicar antioxidantes se interfiere con estos eventos.

II. Modifica la técnica para tener mejor eficiencia en lo hallado en un trabajo anterior de nuestro laboratorio, estableciendo que células U937 individualizadas (no fusionadas) sometidas a fuerza centrífuga, inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de anillos de actina, aumenta el número de células TRAP positivas y la actividad resortiva, sin necesidad de las citoquinas típicas RANKL y M-CSF. La confirmación de este resultado es muy importante porque indica que la resorción ósea la puede realizar

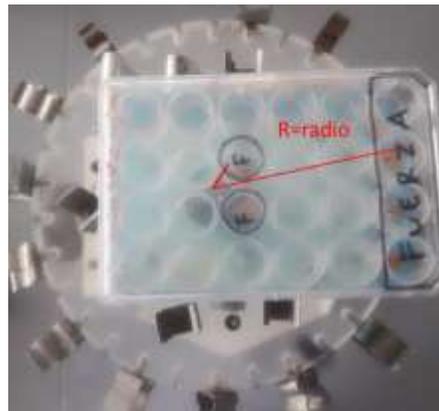
células no fusionadas. Antes, se pensaba que la actividad osteoclastogénica ocurría solamente después de la fusión espontánea de varias células durante la diferenciación y maduración del osteoclasto o con la fusión química mediante PEG.

III. Los tratamientos reductores podrían ser una alternativa para la prevención y/o control en distintas patologías que implican estrés celular, incluidos los casos en los que se aplican fuerzas o se generan estrés oxidativo por infecciones, por alteraciones bioquímicas o de cualquier otra índole.

ANEXOS

Fuerza centrífuga relativa: $RCF = 1,12 \times R \times (RPM/1000)^2$

	Fuerza centrífuga relativa
Fuerza radio 2	Baja= $2,0 \times 10^{-5}$ Media= $2,0 \times 10^{-3}$ Alta = 0,0143
Fuerza radio 8	Baja= $8,0 \times 10^{-5}$ Media= $8,0 \times 10^{-3}$ Alta= 0,0573



	Fuerza centrífuga relativa
Fuerza Antioxidantes	Baja= $2,0 \times 10^{-5}$ Media= $2,0 \times 10^{-3}$ Alta = 0,0143
Fuerza Agonistas de PPAR gamma	Baja= $4,0 \times 10^{-5}$ Media= $4,0 \times 10^{-5}$ Alta= 0,0286
Fuerza Oxidantes	Baja= $8,0 \times 10^{-5}$ Media= $8,0 \times 10^{-3}$ Alta= 0,0573



Fotografías correspondientes a actividad TRAP+ en células colocadas en el centro y periferia del rotor.

Células sujetas a fuerza ubicadas en el centro del rotor

Foto periferia del hueso

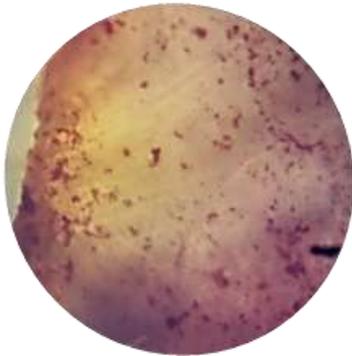


Foto centro del hueso

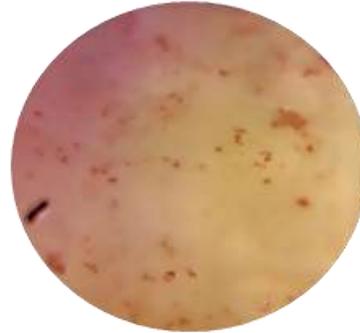
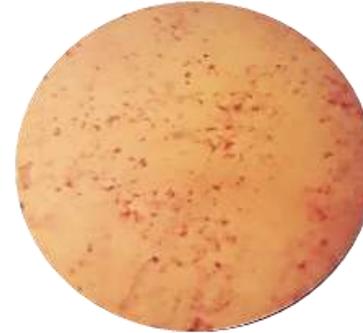


Foto periferia del hueso



Células sujetas a fuerza ubicadas en la periferia del rotor

Foto periferia del hueso

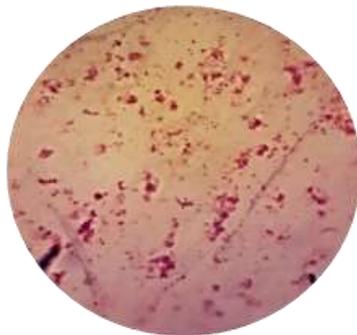


Foto centro del hueso

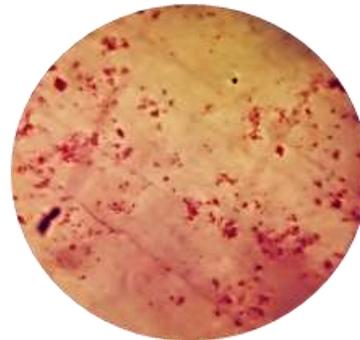
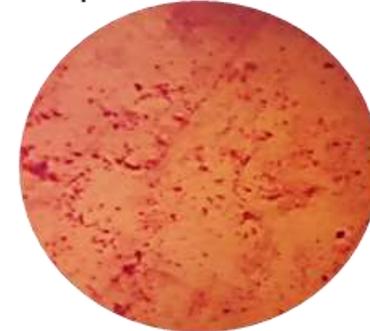


Foto periferia del hueso



Células con oxidante DMNQ en la periferia del rotor

Foto periferia del hueso



Foto centro del hueso

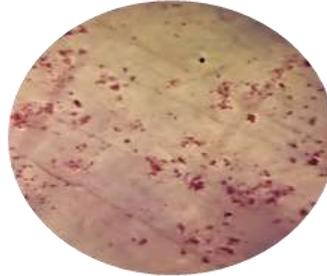
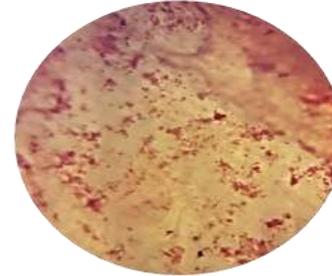


Foto periferia del hueso



Células con antioxidante NAC en el centro del rotor

Foto periferia del hueso

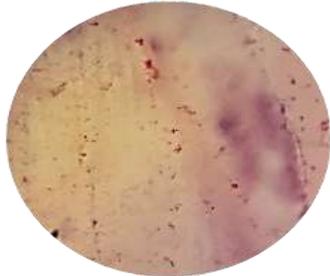


Foto centro del hueso

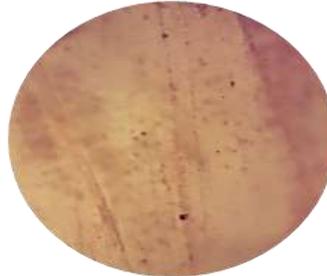
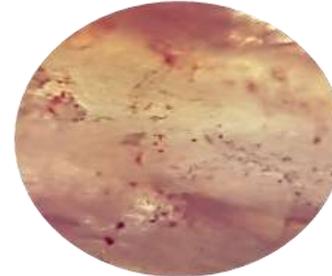


Foto periferia del hueso



Células con agonista de PPAR gamma retinol en el centro del rotor

Foto periferia del hueso

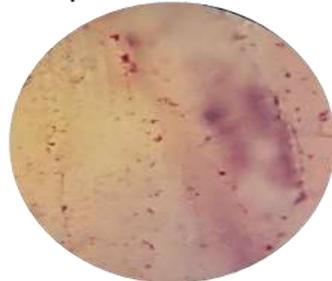
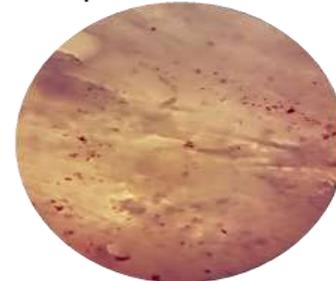


Foto centro del hueso



Foto periferia del hueso



Fotografías correspondientes a lagunas de resorción en células colocadas en el centro y periferia del rotor.

Células sujetas a fuerza ubicadas en el centro del rotor

Foto periferia del hueso



Foto centro del hueso



Foto periferia del hueso



Células sujetas a fuerza ubicadas en la periferia del rotor

Foto periferia del hueso



Foto centro del hueso

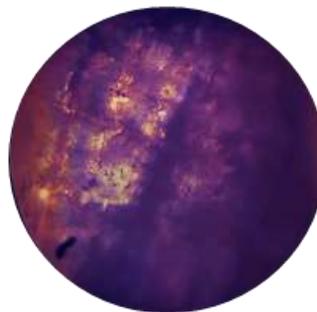


Foto periferia del hueso



Células con oxidante DMNQ en la periferia del rotor

Foto periferia del hueso



Foto centro del hueso



Foto periferia del hueso



Células con antioxidante NAC en el centro del rotor

Foto periferia del hueso



Foto centro del hueso

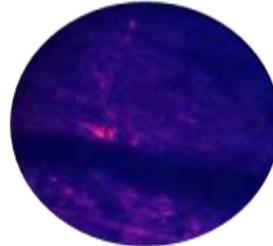


Foto periferia del hueso



Células con agonista de PPAR gamma retinol en el centro del rotor

Foto periferia del hueso



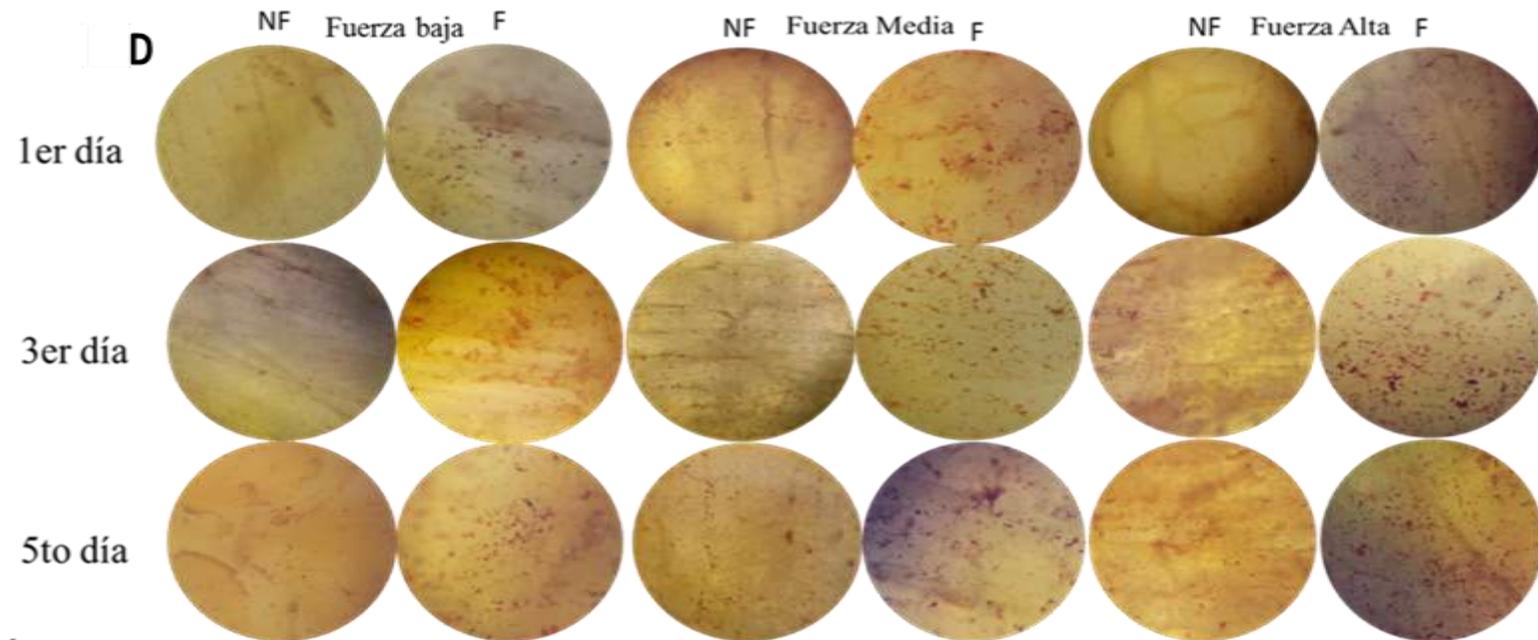
Foto centro del hueso



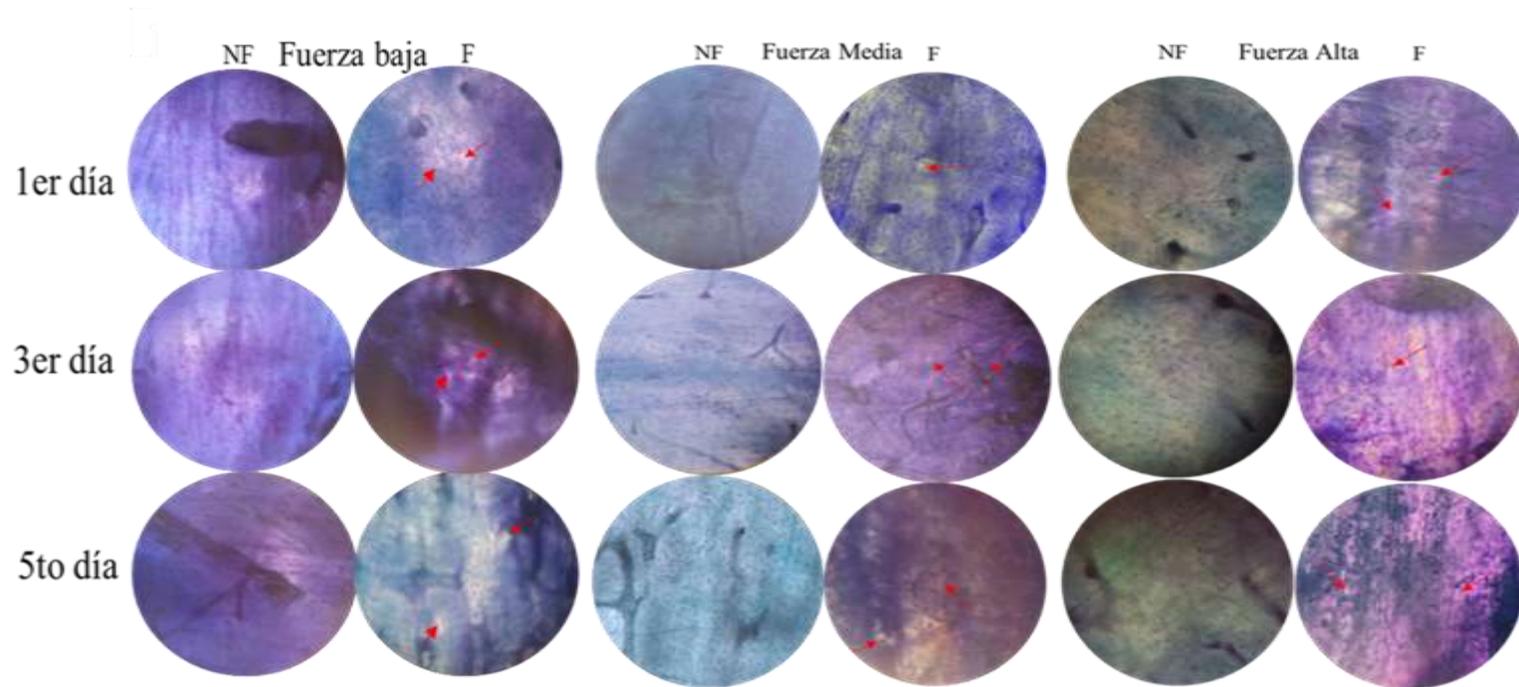
Foto periferia del hueso



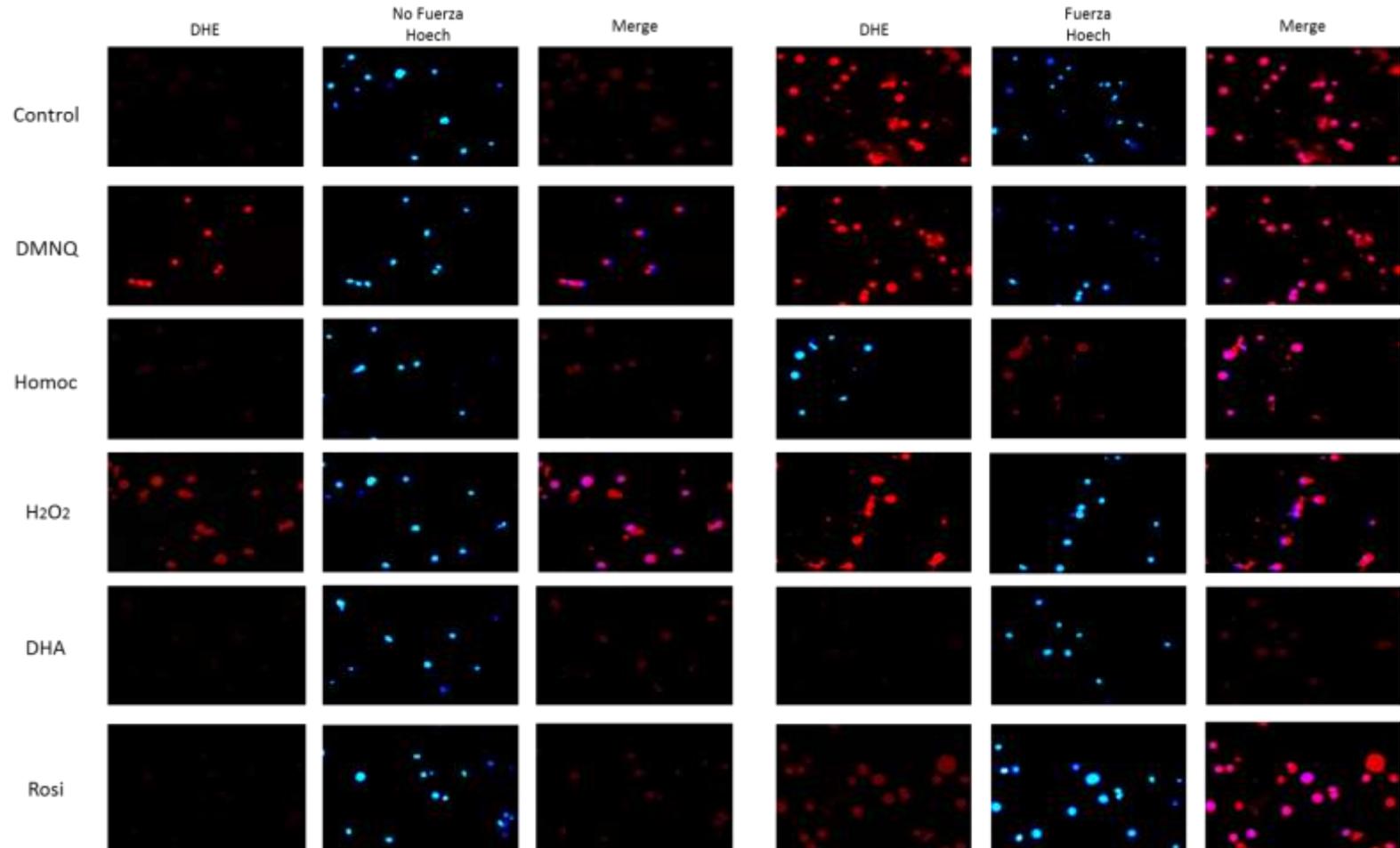
Actividad TRAP de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de diferentes frecuencias 3, 30 y 80 r.p.m.

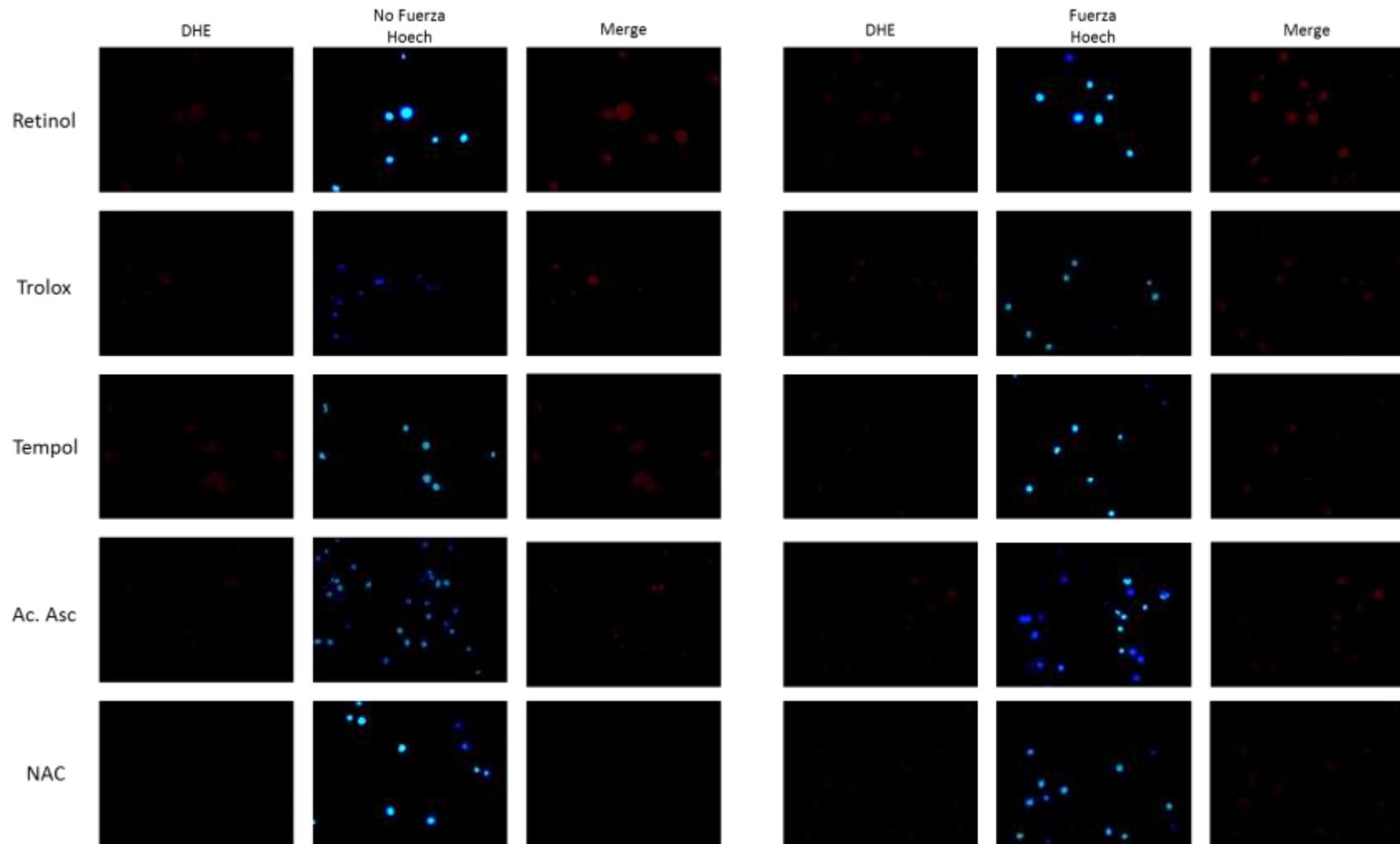


Actividad resortiva de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de diferentes frecuencias 3, 30 y 80 r.p.m.

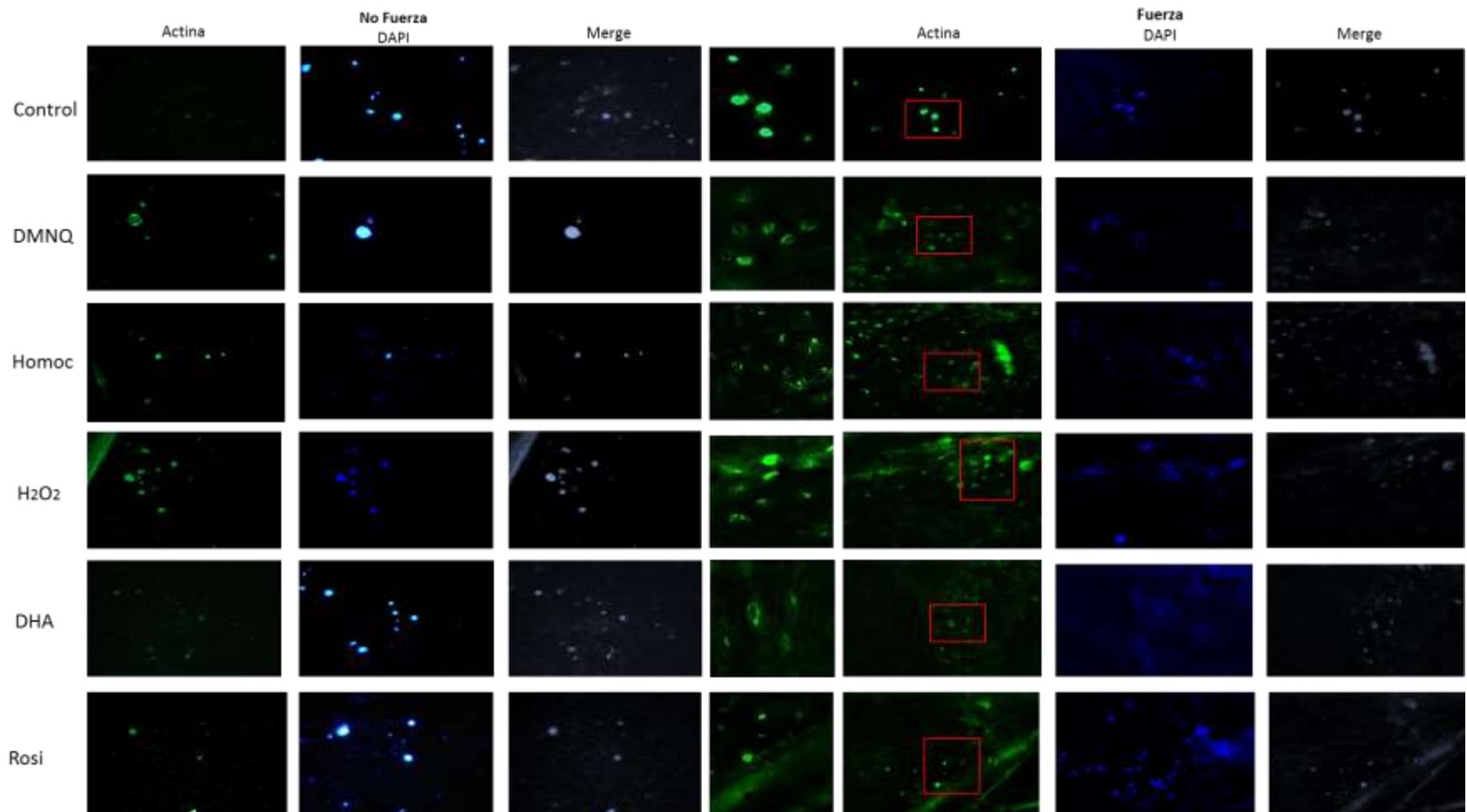


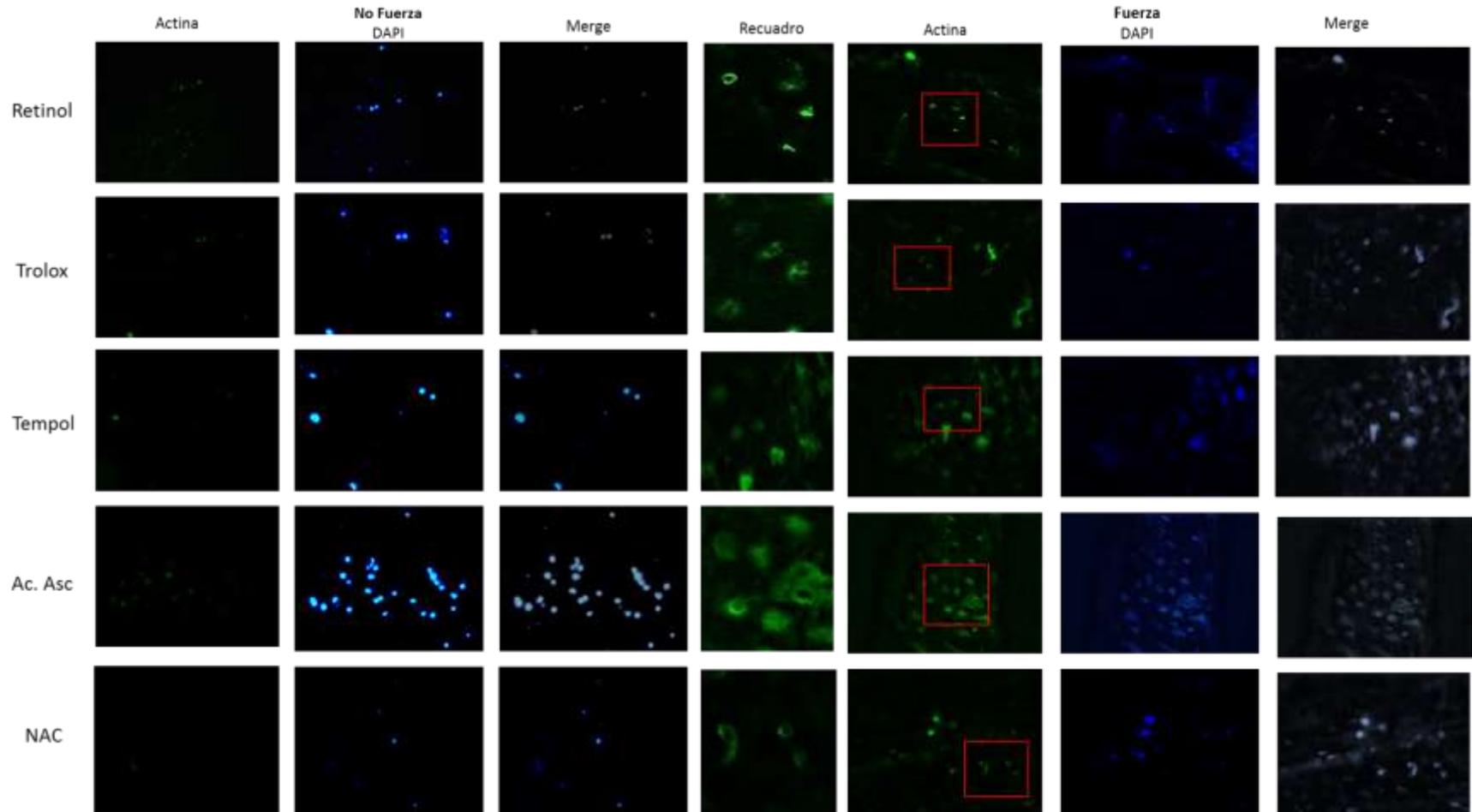
Expresión de ROS de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 30 r.p.m durante 3 días con adición previa de oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma.



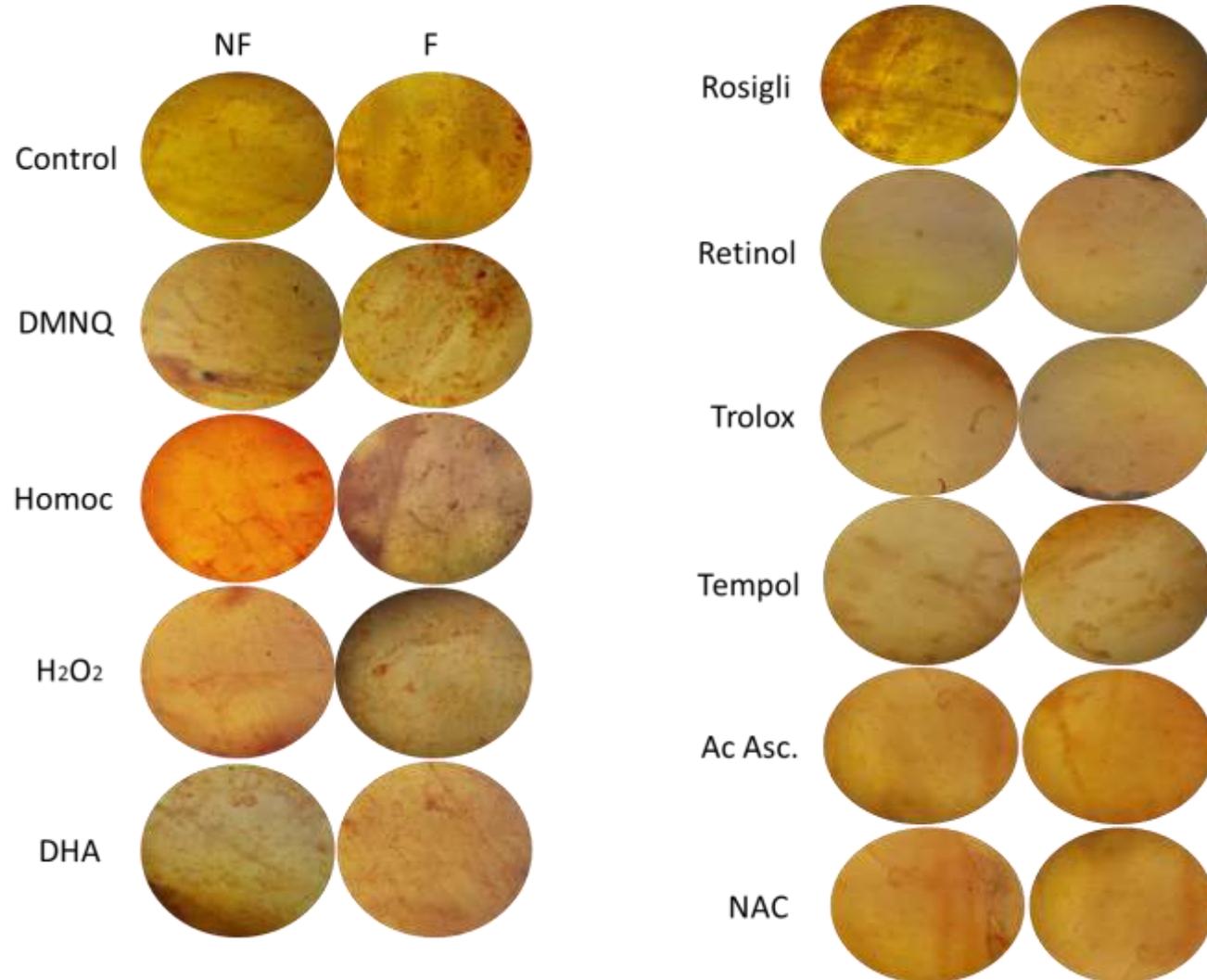


Formación de anillos de actina de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 30 r.p.m durante 3 días con adición previa de oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma.

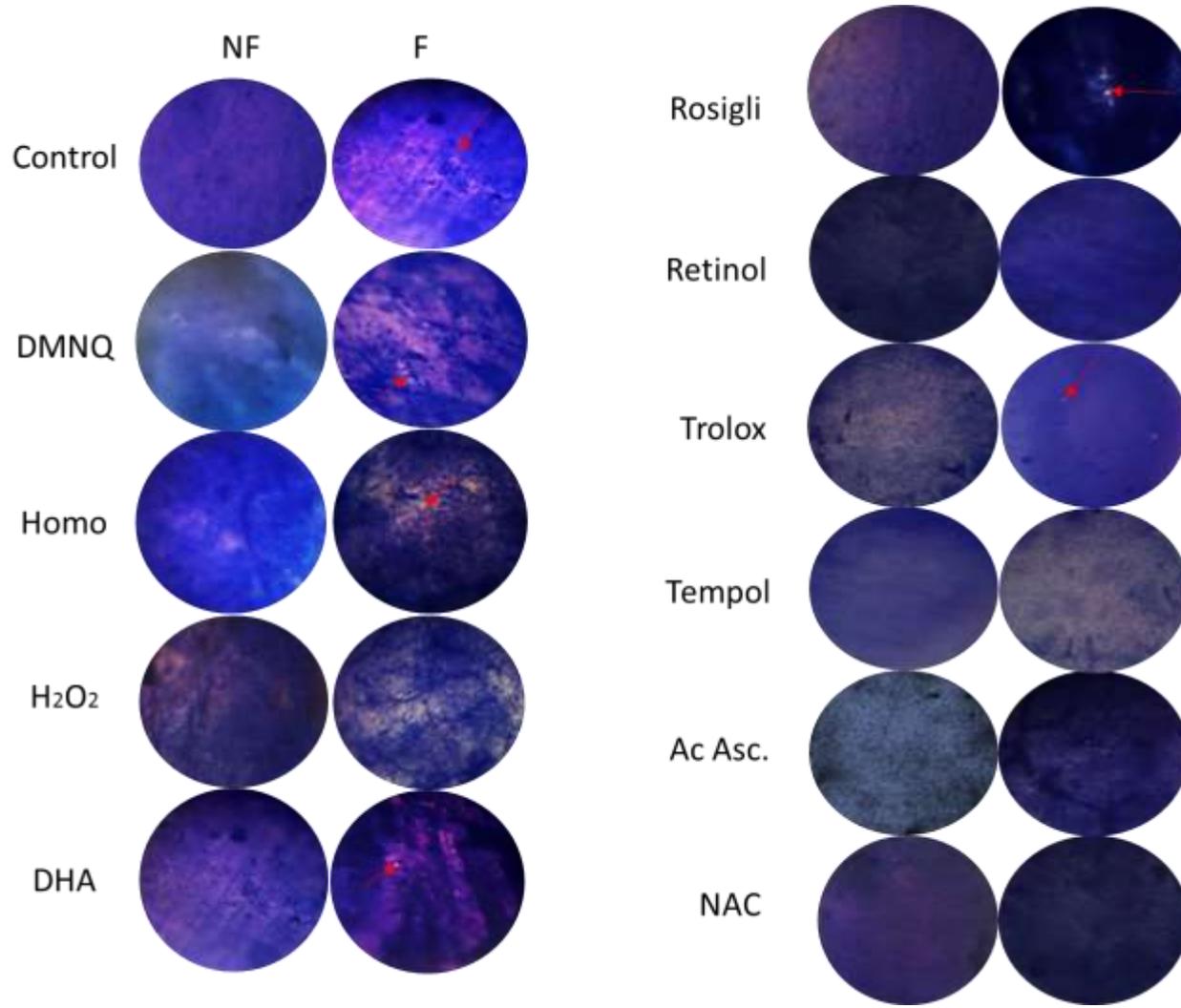




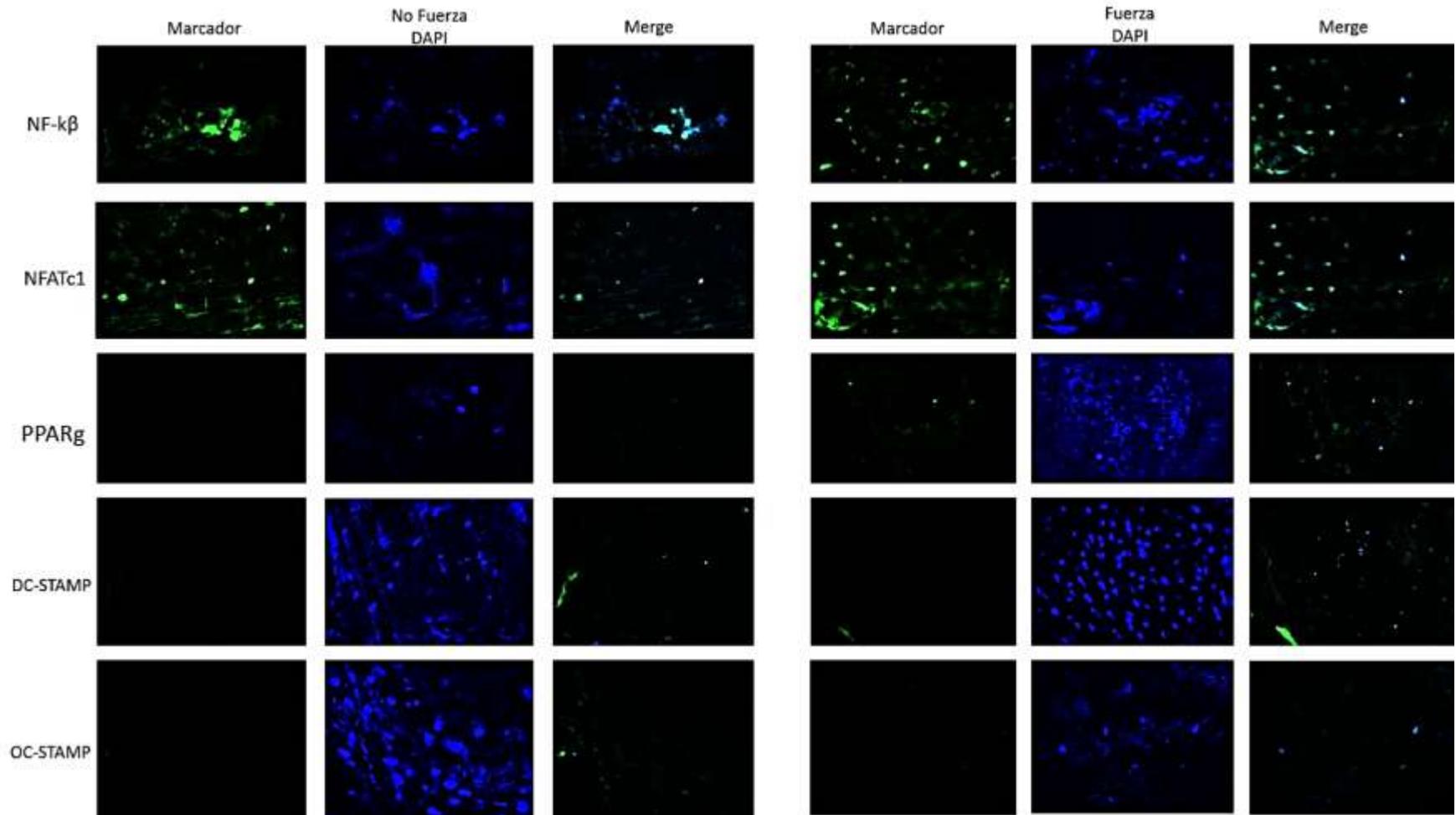
Actividad TRAP de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 30 r.p.m durante 3 días con adición previa de oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma.

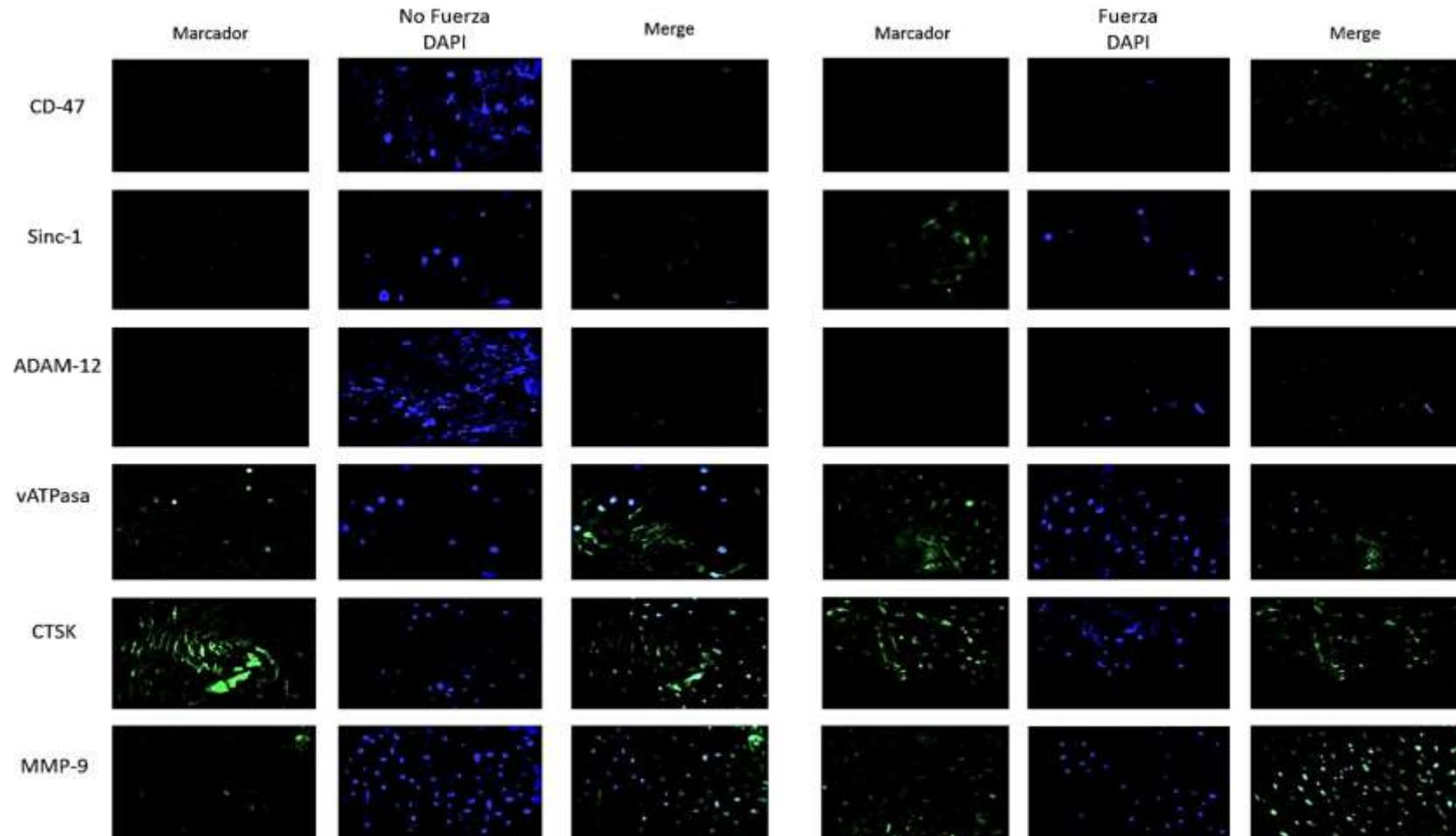


Actividad resortiva de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 30 r.p.m durante 3 días con adición previa de oxidantes, antioxidantes y agonistas de PPAR gamma.

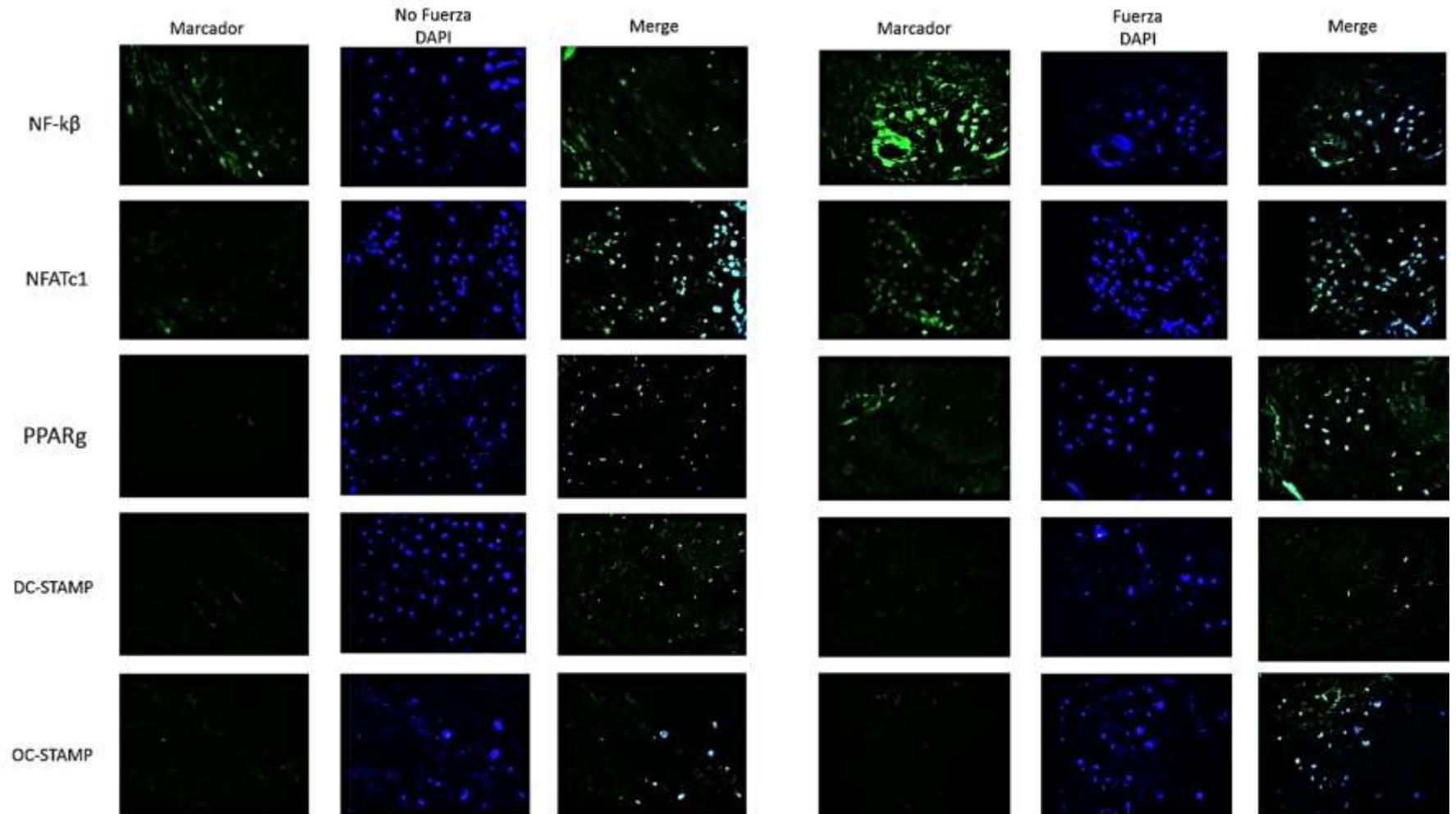


Expresión de marcadores de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 30 r.p.m durante 3 días.





Expresión de marcadores de células U937 sometidas a fuerza centrífuga de 30 r.p.m durante 3 días, con adición del oxidante DMNQ.



BIBLIOGRAFÍA

1. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292-304.
2. Klein M.J, *Biology of Normal Bone*. Biomedical Sciences Encyclopedia of Disease Mechanisms 2014;753–768.
3. Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J*. 2016;52(1):12-7.
4. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug. Targets Inflamm Allergy*. 2005;4:325–328.
5. Epari D.R., Schell H, Bail H.J, Duda G.N. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone*. 2006;38:864–870.
6. Delaine-Smith, et al. Laboratory methods: Preclinical models for in vitro mechanical loading of bone-derived cells. *BoneKEy Reports*. 2015;4(1):1-12.
7. Murillo A, Guerrero C.A, Acosta O, Cardozo. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrofage fusion, *Biol.Res*. 2010;43:205-224.
8. Manrique E, Castillo L.M, Lazala O, Guerrero C.A, Acosta O. Bone resorptive activity of human peripheral blood mononuclear cells after fusion with polyethylene glicol, *J. bone miner metab*, 2016;1-15.
9. Pazos L, Análisis de la actividad resortiva de células fibroblastoides (cultivo primario gingival) luego de someterlas a fuerza centrífuga o fusionarlas con PEG. [Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2013.
10. Montero A. Evaluación de la capacidad de diferenciación de células de sangre periférica hacia el linaje osteoclástico en diferentes tiempos de aplicación de fuerza tensil. [Tesis]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2016.
11. Ke K, Sul O, Chung S, Suh J, Choi HS. Lack of NOD2 attenuates ovariectomy-induced bone loss via inhibition of osteoclasts. *J Endocrinol*. 2017;16-0591.
12. Hyeon S, Lee H, Yang Y, Jeong W. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation. *Free Radic Biol Med*. 2013;65:789-99.
13. Li DZ, Zhang QX, Dong XX, Li HD, Ma X. Treatment with hydrogen molecules prevents RANKL-induced osteoclast differentiation associated with inhibition of ROS formation and inactivation of MAPK, AKT and NF-kappa B pathways in murine RAW264.7 cells. *J Bone Miner Metab*. 2014;32(5):494-504.
14. Kang IS, Kim C. NADPH oxidase gp91phox contributes to RANKL-induced osteoclast differentiation by upregulating NFATc1. *Sci Rep*. 2016;29;6.

15. Rahman MM, Bhattacharya A, Fernandes G. Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol.* 2008;214(1):201-9.
16. Yang CR, Lai CC. Thiazolidinediones inhibit TNF- α -mediated osteoclast differentiation of RAW264.7 macrophages and mouse bone marrow cells through downregulation of NFATc1. *Shock.* 2010;33(6):662-7.
17. Nakanishi A, Tsukamoto I. n-3 polyunsaturated fatty acids stimulate osteoclastogenesis through PPAR γ -mediated enhancement of c-Fos expression, and suppress osteoclastogenesis through PPAR γ -dependent inhibition of NF κ B activation. *J Nutr Biochem.* 2015;26(11):1317-27.
18. Nakashima T. Stress and cell communication between bone cells. *Clin Calcium.* 2013;23(11):1595-603.
19. Sánchez-Duffhues G, Hiepen C, Knaus P, Dijke P. Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone.* 2015; 43–59.
20. Raggat L, Partridge N. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103-8.
21. Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016;8(6):225-235.
22. Feng X, McDonald J. Disorders of Bone Remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 121–145.
23. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port.* 2007;32(2):103-10.
24. Arkady Rutkovskiy F, Kåre-Olav Stensløykken E and Ingvar Jarle Vaage. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Med Sci Monit Basic Res.* 2016; 22: 95–106.
25. Shahi M, Peymani A, Sahmani M. Regulation of Bone Metabolism. *Rep Biochem Mol Biol.* 2017;5(2):73-82.
26. Jensen ED, Gopalakrishnan R, Westendorf JJ. Regulation of gene expression in osteoblasts. *Biofactors.* 2010;36(1):25-32.
27. Bar-Shavit Z. The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell.
28. Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep.* 2014;3:570.
29. Suda T, Kobayashi K, Jimi E, Udagawa N, Takahashi N. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Found Symp.* 2001;232:235-47.
30. Li, Y., Toraldo, G., Li, A., Yang, X., Zhang, H., Qian, W. P., and Weitzmann, M. N. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood.* 2007; 109, 3839–3848.

31. Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(4):292-304.
32. Murthy MB Osteoimmunology - Unleashing the concepts. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15(3):190-8.
33. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(5):3212-8.
34. Boyce B, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9:1-7.
35. Feng Z. RANKing Intracellular Signaling in Osteoclasts. *IUBMB Life.* 2005;57(6): 389 – 395.
36. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger J. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *TRENDS in Molecular Medicine.* 2006;12(1):17-25.
37. Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J.* 2016 Jan;52(1):12-7.
38. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, et al.: TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999;13:1015-1024.
39. Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J.* 2016;52(1):12-7.
40. Lacey DL, Tan HL, Lu J, Kaufman S, Van G, Qiu W, et al. Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo. *Am J Pathol.* 2000;157(2):435-48.
41. Liu W1, Xu C, Zhao H, Xia P, Song R, Gu J, et al. Osteoprotegerin Induces Apoptosis of Osteoclasts and Osteoclast Precursor Cells via the Fas/Fas Ligand Pathway. *PLoS One.* 2015;10(11):e0142519.
42. 17. Ogle, Brenda M.; Platt, Jeffrey L. The Biology of Cell Fusion: Cells of different types and from different species can fuse, potentially transferring disease, repairing tissues and taking part in development. *American Scientist.* 2004;92 (5): 420–427.
43. Chiu YH, Ritchlin CT. DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J Cell Physiol.* 2016;231(11):2402-7
44. Matsubara T, Kinbara M, Maeda T, Yoshizawa M, Kokabu S, Takano Yamamoto T. Regulation of osteoclast differentiation and actin ring formation by the cytolinker protein plectin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;489(4):472-476.
45. Chiu YH, Ritchlin CT. DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J Cell Physiol.* 2016;231(11):2402-7.

46. Yagi M, Miyamoto T, Toyama Y, Suda T. Role of DC-STAMP in cellular fusion of osteoclasts and macrophage giant cells. *J Bone Miner Metab.* 2006;24(5):355-8.
47. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med.* 2005;202(3):345-51.
48. Yagi M, Ninomiya K, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Morita K, Hosogane N, Matsuo K, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T. Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *J Bone Miner Res.* 2007;22:992–1001.
49. Yagi M, Ninomiya K, Fujita N, Suzuki T, Iwasaki R, Morita K, et al. Induction of DC-STAMP by alternative activation and downstream signaling mechanisms. *J Bone Miner Res.* 2007;22(7):992-1001.
50. Yang M, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR. Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* 2008;215(2):497-505.
51. Witwicka H, et al. Studies of OC-STAMP in Osteoclast Fusion: A New Knockout Mouse Model, Rescue of Cell Fusion, and Transmembrane Topology. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128275.
52. Han X, Sterling H, et al. CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation. *J Biol Chem.* 2000;275(48):37984-92.
53. Søre K, Andersen TL, et al. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone.* 2011;48(4):837-46.
54. Møller AM, Delaissé JM, Søre K. Osteoclast Fusion: Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at Different Stages of Nuclearity. *J Cell Physiol.* 2017;232(6):1396-1403.
55. Verrier S, Hogan A, McKie N, Horton M. ADAM gene expression and regulation during human osteoclast formation. *Bone.* 2004;35(1):34-46.
56. Bartholin L, Destaing O, Forissier S, Martel S, Maguer-Satta V, Jurdic P, et al. FLRG, a new ADAM12-associated protein, modulates osteoclast differentiation. *Biol Cell.* 2005;97(7):577-88.
57. Ma G, Ainola M, et al. Increased expression and processing of ADAM 12 (meltrin-alpha) in osteolysis associated with aseptic loosening of total hip replacement implants. *J Rheumatol.* 2005;32(10):1943-50.
58. Soysa, et al. Osteoclast formation and differentiation: An overview. *J Med Dent Sci* 2012;59:65–74.
59. Xu Feng, Steven L. Teitelbaum. Osteoclasts: New Insights. *Bone Research.* 2013;1: 11-26.

60. Kyoji Ikeda, Sunao Takeshita. Factors and Mechanisms Involved in the Coupling from Bone Resorption to Formation: How Osteoclasts Talk to Osteoblasts. *J Bone Metab* 2014;21:163-167.
61. Jurdic P, Saltel F, Chabadel A, Destaing O. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(3-4):195-202.
62. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 2008;41(3):218-23.
63. Blumer MJ, Hausott B, Schwarzer C, Hayman AR, Stempel J, Fritsch H. Role of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in long bone development. *Mech Dev.* 2012;129(5-8):162-76.
64. Troen BR. The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug News Perspect.* 2004;17(1):19-28.
65. Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, et al. Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:293-303.
66. Duong le T, Leung AT, Langdahl B. Cathepsin K Inhibition: A New Mechanism for the Treatment of Osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(4):381-97.
67. Kaneshita Y, Goda S, Kawamoto T. The effect of matrix metalloproteinase-9 on the differentiation into osteoclast cells on RAW264 cells. *orthodontic waves.* 2007;66: 122–128.
68. Qin A, Cheng TS, Pavlos NJ, Lin Z, Dai KR, Zheng MH. V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(9):1422-35.
69. Pignatelli, P. Pulcinelli, F.M., Lenti, L., Gazzaniga, P.P., Violi, F. (1998) Hydrogen Peroxide Is Involved in Collagen-Induced Platelet Activation, *Blood*, 91 (2), 484-490.
70. Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res.* 2004;301(2):119-27.
71. D. Callaway, J. Jiang, Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases, *J. Bone Miner Metab.* 2015: 33:359-370.
72. NK Lee, YG Choi, JY Baik, SY Han, DW Jeong, YS Bae, N Kim, SY Lee. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood.* 2005;106:852–859.
73. Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res.* 2004;301(2):119-27.

74. Srinivasan S, Koenigstein A, Joseph J, Sun L, Kalyanaraman B, Zaidi M, Avadhani NG. Role of mitochondrial reactive oxygen species in osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:245-52.
75. Watanabe, H.J Forman. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003;411:145–157.
76. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation. *Nutr J.* 2004;10;3:4.
77. Misra HP. Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *J Biol Chem.* 1974;249:2151–2155.
78. T Mahaseth, A Kuzminov. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutat Res.* 2017 Jul;773:274-281.
79. JM Lean, CJ Jagger, B Kirstein, K Fuller, TJ Chambers. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology.* 2005;146(2):728-35.
80. Re, R.; Pellegrini, N.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol. Med.* 1999, 26, 1231-1237.
81. Poljsak B, Raspor P. The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox in vitro: a comparative study. *J Appl Toxicol.* 2008;28(2):183-8.
82. JH Lee, HN Kim, D Yang, K Jung, HM Kim. Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. *J Biol Chem.* 2009;284(20):13725-34.
83. Francischetti IM, Gordon E, Bizzarro B, Gera N, Andrade BB, Oliveira F, et al. Tempol, an intracellular antioxidant, inhibits tissue factor expression, attenuates dendritic cell function, and is partially protective in a murine model of cerebral malaria. *PLoS One.* 2014;9(2):e87140.
84. Boyacioglu M, Sekkin S, Kum C, Korkmaz D, Kiral F, Yalinkilinc HS, et al. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66(9-10):407-13.
85. X. H. Xiao, Y. Liao, D. ZhouR, DaiL, YuanX, P. Wu. Ascorbic acid inhibits osteoclastogenesis of RAW264.7 cells induced by receptor activated nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in vitro. *Journal of Endocrinological Investigation.* 2005; 28(5):253–260.
86. Le Nihouannen, JE Barralet, JE Fong, SV Komarova. Ascorbic acid accelerates osteoclast formation and death. *Bone.* 2010;46(5):1336-43.
87. Maheshwari A1, Misro MM, Aggarwal A, Sharma RK, Nandan D. N-acetyl-L-cysteine counteracts oxidative stress and prevents H₂O₂ induced germ cell

- apoptosis through down-regulation of caspase-9 and JNK/c-Jun. *Mol Reprod Dev.* 2011;78(2):69-79.
88. Fontani F, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Glutathione, N-acetylcysteine and lipoic acid down-regulate starvation-induced apoptosis, RANKL/OPG ratio and sclerostin in osteocytes: involvement of JNK and ERK1/2 signalling. *Calcif Tissue Int.* 2015;96(4):335-46.
89. Ziouzenkova, Perrey, Marx, Bacqueville, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Curr Atheroscler Rep.* 2002 Jan;4(1):59-64.
90. CR Yang, CC Lai, Thiazolidinediones inhibit TNF-alpha –mediated osteoclast differentiation of RAW 264.7 macrophages and mouse bone marrow cells through downregulation of NFATc1, *Schock.* 2010; 33:662-667.
91. W Yihong, C Ling-Wa, M Ronald. PPAR-g regulates osteoclastogenesis in mice. *Nature.* 2007; 13(12): 1496-1503.
92. W Balkan, Rodríguez-Gonzalez, M Pang, I Fernandez, BR Troen. Retinoic acid inhibits NFATc1 expression and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab.* 2011;29(6):652-61.
93. M. Yoshimatsu, Y. Shibata, H. Kitaura et al. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism.* 2006; 24(1):0–27.
94. M.C. d'Agostino, K. Craig, E. Tibalt, S. Respizzi. Shock wave as biological therapeutic tool: From mechanical stimulation to recovery and healing, through mechanotransduction. *International Journal of Surgery.* 2015;24(1):147-153.
95. Yavropoulou MP, Yovos JG. The molecular basis of bone mechanotransduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2016; 16(3):221-36.
96. Robin Michael Delaine-Smith, Behzad Javaheri, Jennifer Helen Edwards, Marisol Vazquez and Robin Mark Howard Rumney. Preclinical models for in vitro mechanical loading of bone-derived cells. *Bonekey Rep.* 2015;19;4:728.
97. Lau E, Al-Dujaili S, Guenther A, Liu D, Wang L, You L. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. *Bone* 2010; 46: 1508–1515.
98. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech* 1994; 27: 339–360.
99. Zhou X, Liu D, You L, Wang L. Quantifying fluid shear stress in a rocking culture dish. *J Biomech* 2010; 43: 1598–1602.

100. Morris HL, Reed CI, Haycock JW, Reilly GC. Mechanisms of fluid-flow-induced matrix production in bone tissue engineering. *Proc Inst Mech Eng H* 2010; 224: 1509–1521.
101. Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, Monbureau O. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. *J Cell Sci* 1985; 75: 35–42.
102. Hayakawa T, Yoshimura Y, Kikuri T, Matsuno M, Hasegawa T, Fukushima K, et al. Optimal compressive force accelerates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Mol Med Rep*. 2015;12(4):5879-85.
103. Murillo A, Guerrero CA, Acosta O, Cardozo CA. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol Res*. 2010;43:205-224.
104. Manrique E, Luz, Castillo M, Lazala O, Guerrero CA, Acosta O. Bone resorptive activity of human peripheral blood mononuclear cells after fusion with polyethylene glycol. *J Bone Miner Metab*. 2016:1-15.
105. J Rubin, C Rubin, CR Jacobs. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*. 2006;367:1-16.
106. S Judex, X Lei, D Han, C Rubin. Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. *Journal of Biomechanics*. 2007;40:1333–1339.
107. M.P. Yavropoulou, J.G. Yovos. The molecular basis of bone mechanotransduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2016; 16(3):221-236.
108. Wang L, Wang Y, Han Y, et al. In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11911-6.
109. Price C, Zhou X, Li W, Wang L. Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow. *J Bone Miner Res* 2011;26:277-85.
110. JK Nulend, AD Bakker, RG. Bacabac, A Vatsa, S Weinbaum. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bone*. 2013;54:182–190
111. AM Parfitt. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption — bone flow theory. *Clin Orthop Relat Res*. 1977;127:236-47.
112. H Hemmatian, AD Bakker, J Klein-Nulend, GH van Lenthe. Aging, Osteocytes, and Mechanotransduction. *Curr Osteoporos Rep*. 2017; 15:401-411.
113. LI Plotkin, T Bellido. Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(10):593-605.

114. H Kitaura, K Kimura, M Ishida, H Sugisawa, H Kohara, M Yoshimatsu, et al. Effect of cytokines on osteoclast formation and bone resorption during mechanical force loading of the periodontal membrane. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:617032.
115. CM Reijnders, et al. Effect of mechanical loading on insulin-like growth factor-I gene expression in rat tibia. *J. Endocrinol*. 2007; 192, 131–140.
116. M Hughes-Fulford, M. Signal transduction and mechanical stress. *Sci. STKE* 2004, RE12.
117. XY Xu, C Guo, YX Yan, Y Guo, RX Li, M Song, et al. Differential effects of mechanical strain on osteoclastogenesis and osteoclast-related gene expression in RAW264.7 cells. *Molecular medicine reports* 2012;6: 409-415.
118. Y Guo, Y Wang, Y Liu, H Wang, C Guo, X Zhang. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. *Gene*. 2006;367:1-16.
119. Fontani F, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Glutathione, N-acetylcysteine and lipoic acid down-regulate starvation-induced apoptosis, RANKL/OPG ratio and sclerostin in osteocytes: involvement of JNK and ERK1/2 signalling. *Calcif Tissue Int*. 2015;96(4):335-46.
120. M. Yoshimatsu, Y. Shibata, H. Kitaura et al. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. 2006; 24(1)2:0–27.
121. Enhos S, Veli I, Cakmak O, Ucar FI, Alkan A, Uysal T. OPG and RANKL levels around miniscrew implants during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144(2):203-9.
122. Kitaura H, Yoshimatsu M, Fujimura Y, Eguchi T, Kohara H, Yamaguchi A, Yoshida N. An anti-c-Fms antibody inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2008;87(4):396-400.
123. Y Shafieyan, K Tiedemann, SV Komarova, T Quinn. Effects of low frequency cyclic mechanical stretching on osteoclastogenesis. *Journal of Biomechanics*. 2014;47;3750–3757.
124. X Xu, C Guo, Y Yan, Y Guo, R Li, M Song. Differential effects of mechanical strain on osteoclastogenesis and osteoclast-related gene expression in RAW264.7 cells. *Molecular medicine reports* 2012;6;409-415.
125. Louis KS, Siegel AC. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol*. 2011;740:7-12.
126. K. Diercke, S. Sen, A. Kohl CJL, Erber and R. Compression-dependent Up-regulation of Ephrin-A2 in PDL Fibroblasts Attenuates. *J Dent Res*. 2011;90(9):1108-1116.

127. K. Diercke, S. Sen, A. Kohl CJL, Erber and R. Compression-dependent Up- regulation of Ephrin-A2 in PDL Fibroblasts Attenuates. *J Dent Res.* 2011;90(9):1108-1116.
128. Chacko BK, Zhi D, Darley-USmar VM, Mitchell T. The Bioenergetic Health Index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes. *Redox Biology.* 2016;8:43-50.
129. Park M, Kwon H, Lee E, Lee H, Ahn K, Kim M, et al. DMNQ-S17 inhibits constitutive NF-kappaB activation leading to induction of apoptosis through the activation of caspase-3 in human myeloid leukemia U937 cells. *Life Sci.* 2008 26;83(13-14):460-467.
130. Herrmann M, Widmann T, Colaianni G, Colucci S, Zallone A, Herrmann W. Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem.* 2005;51(12):2348-2353.
131. Lee J, Kim H-N, Yang D, Kyoung Suk J, Hyun-Man K, Hong-Hee K, et al. Trolox Prevents Osteoclastogenesis by Suppressing RANKL Expression and Signaling. *The Journal of Biological Chemistry.* 2009;284(20):13725-13734.
132. Wuensch T, Thilo F, Krueger K, Scholze A, Ristow M, Tepel M. High Glucose-Induced Oxidative Stress Increases Transient Receptor Potential Channel Expression in Human Monocytes. *Diabetes.* 2010;59(4):844-849.
133. Le Nihouannen D, Barralet J, Fong J, Komarova S. Ascorbic acid accelerates osteoclast formation and death. *Bone.* 2010;46(5):1336-1343.
134. Otsuka E, Kato Y, Hirose S, Hagiwara H. Role of ascorbic acid in the osteoclast formation: induction of osteoclast differentiation factor with formation of the extracellular collagen matrix. *Endocrinology.* 2000;141(8):3006-3011.
135. Cao J, Picklo M. N-acetylcysteine supplementation decreases osteoclast differentiation and increases bone mass in mice fed a high-fat diet. *J Nutr.* 2014;144(3):289-296.
136. Abe E. Kasonga, Vishwa Deepak, Marlina C. Kruger, Magdalena Coetzee. Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid Suppress Osteoclast Formation and Activity in Human CD14+ Monocytes, In vitro. *PlosOne.* 2015; 13;10(4):e0125145.
137. Hu L, Lind T, Sundqvist A, Jacobson A, Melhus H. Retinoic acid increases proliferation of human osteoclast progenitors and inhibits RANKL-stimulated osteoclast differentiation by suppressing RANK. *PLoS One.* 2010;5(10):e13305.
138. Jung Y, Kim H, Sun HM, Sue GR, Jeong W. Dynein light chain LC8 negatively regulates NF-kB through the redox-dependent interaction with Ikb α . *J Biol Chem.* 2008;283(35):23863-23871.
139. J Plutzky. The PPAR-RXR transcriptional complex in the vasculature: energy in the balance. *Circ Res.* 2011;108(8);1002-16.

140. Duester G. Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell*. 2008; 134(6): 921–931.
141. Conaway H, et al. Retinoids inhibit differentiation of hematopoietic osteoclast progenitors. *FASEB J*. 2009;23(10):3526-3538.
142. Hu L, Lin T, Sundqvist A, Jacobson A, Melhus H. Retinoic acid increases proliferation of human osteoclast progenitors and inhibits RANKL-stimulated osteoclast differentiation by suppressing RANK- *PLoS One*. 2010;5(10):e13305.
143. Song EA, Lim JW, Kim H. Docosahexaenoic acid inhibits IL-6 expression via PPAR γ -mediated expression of catalase in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;88:60-68.
144. Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat Med*. 2007a;13:1496–1503.
145. Nakanishi A, Tsukamoto I. n-3 polyunsaturated fatty acids stimulate osteoclastogenesis through PPAR γ -mediated enhancement of c-Fos expression, and suppress osteoclastogenesis through PPAR γ -dependent inhibition of NF κ B activation. *J Nutr Biochem*. 2015;26(11):1317-27.
146. Lee SE, Lim JW, Kim H. Activator protein-1 mediates docosahexaenoic acid-induced apoptosis of human gastric cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1171:163-9.
147. Park JY, et al. A novel PPAR γ agonist, KR62776, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and activity by inhibiting MAP kinase pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378(3):645-9.
148. Fukunaga T, Zou W, Rohatgi N, Colca JR, Teitelbaum SL. An insulin-sensitizing thiazolidinedione, which minimally activates PPAR γ , does not cause bone loss. *J Bone Miner Res*. 2015;30(3):481-8.