



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD  
OSTEOCLÁSTICA CON LA APLICACIÓN DE AGENTES  
REDUCTORES U OXIDANTES EN CÉLULAS U937  
FUSIONADAS CON POLIETILENGLICOL**

**MARÍA ALEJANDRA RODRÍGUEZ SOTO**

Universidad Nacional de Colombia

FACULTAD DE MEDICINA, MAESTRIA EN BIOQUIMICA

BOGOTA D. C; COLOMBIA

2018



**EVALUACIÓN DE CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD  
OSTEOCLÁSTICA CON LA APLICACIÓN DE AGENTES  
REDUCTORES U OXIDANTES EN CÉLULAS U937  
FUSIONADAS CON POLIETILENGLICOL.**

**MARÍA ALEJANDRA RODRÍGUEZ SOTO**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**MAGISTER EN BIOQUÍMICA**

Director:

**CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA. MD. MSC. PhD**

Línea de Investigación:

Metabolismo óseo

Universidad Nacional de Colombia  
Medicina, Departamento de Bioquímica  
Bogotá D.C, Colombia

2018



*A las incansables mujeres y sus hermosos ojos que me miran con amor y me guían en cada paso, a ustedes María Cristina Soto y Rosa Tulia Rodríguez.*



## **Agradecimientos**

Agradezco a mi abuela, padres y hermano, quienes han permanecido a mi lado durante todo mi proceso de formación académica, impulsando siempre mi aprendizaje y más importante aun apoyando en cada paso la realización de mi proyecto de vida.

Expreso mis agradecimientos al director de esta investigación, el Doctor Carlos Arturo Guerrero, quien a lo largo de mi formación como magister en bioquímica, me ha entregado su apoyo incondicional compartiendo conmigo sus conocimientos haciendo posible la culminación exitosa de este proyecto.

Extiendo mis agradecimientos más sinceros a todos los docentes que hacen parte del programa de la maestría en bioquímica, especialmente a los docentes Orlando Acosta y Alberto Gómez que en equipo con Carlos Guerrero mostraron gran compromiso con mi formación académica integral y quienes inculcaron en mí una actitud y capacidad crítica aplicables para todo el desarrollo de mi proyecto de vida.

Por último, quiero agradecer a los estudiantes de distintas áreas que hacen parte del laboratorio de biología molecular de la facultad de medicina, por su gran apoyo y disposición para compartir sus conocimientos y tiempo, que fueron claves para la realización de esta investigación.

## Resumen

A partir de la teoría de que la fusión celular es esencial para la función del Osteoclasto y su rol en el mantenimiento del control de la masa ósea y osteoclástica, se desarrolló un modelo para la obtención de células similares a osteoclastos que son capaces de realizar resorción utilizando polietilenglicol (PEG). Se demostró que su aplicación en monocitos (línea celular U937) genera fusión, y que este evento es suficiente para la expresión de genes específicos del Osteoclasto, y resorción ósea. El propósito de este trabajo fue investigar los cambios en la actividad resortiva al aplicar distintos agentes oxidantes y reductores sobre este modelo.

**Método:** Se indujo fusión de células U937, para obtener células similares a osteoclastos, con 0.5µl PEG mw:1450 por cada 50.000 células que fueron sembradas sobre láminas de hueso, o un grupo control no tratado con PEG; las células fueron resuspendidas en DMEM con SFB al 10%, y mantenidas bajo una atmosfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 horas; aplicándolos directamente en el medio y en diferentes tiempos, se realizó inducción oxidativa con DMNQ 0.15µM, homocisteína 100µM, peróxido de hidrógeno 50µM o tratamiento con agentes reductores TROLOX 500µM, TEMPOL100µM, ácido ascórbico 50µg/ml, NAC 30mM, GSH 32mM + BME 25µM . Se evaluó presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), tinción para TRAP (fosfatasa ácida tartrato resistente), actividad resortiva y expresión de marcadores osteoclásticos. **Resultados:** La fusión con PEG induce la generación de ROS, el aumento en el porcentaje de células TRAP +, la formación de anillos de actina y el área resorbida con respecto a las células no fusionadas. El tratamiento con agentes oxidantes en los días 0 y 1 después de fusionar con PEG genera un aumento en ROS consecuente con un aumento de TRAP, anillos de actina y resorción ósea, de manera contraria se produjo una disminución de estos con el tratamiento con agentes reductores en estas etapas; el pretratamiento con agentes oxidantes y reductores generó una disminución en la resorción para ambos casos, sin embargo, la aplicación de ambos tipos de tratamiento en los días 2 y 3 después de la fusión con PEG no generó cambios significativos en la resorción. **Conclusión:** La fusión per se implica la generación de ROS, aumentando la expresión de marcadores osteoclastogénicos y actividad resortiva, dichas características se acentúan al aplicar reactivos oxidantes, sugiriendo que el estado oxido reductor de la célula es crítico para la supervivencia, estabilidad de la fusión y para el inicio de la actividad osteoclastogénica **Palabras Clave:** Resorción ósea, Fusión de macrófagos, Osteoclasto, Actividad, PEG, RANKL, Antioxidantes, Oxidantes, Redox status.

## Abstract

Based on the theory regarding nuclear fusion is essential for the osteoclast function and its role in maintaining control of both the bone mass and osteoclastic resorption, a model was developed in order to obtain osteoclasts like cells that are able to bone resorption using polyethylene glycol (PEG). It was demonstrated that its application in monocytes (cell line U937) generates fusion, and this event is enough for the expression of osteoclast specific genes, and bone resorption. The purpose behind this work was to investigate the changes in the resorptive activity when applying different oxidant and reducing agents using this model.

**Method:** Fusion of U937 cells were induced to obtain osteoclast like cells with 0.5  $\mu$ l PEG mw:1450 per 50.000 cells that were seeded in bone slices, or a control group that were not treated with PEG; cells were resuspended in DMEM with SFB at 10%, and kept under a humidified atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub> at 37°C during 2 hours; Applying directly in the culture media and at different times; oxidant induction was achieved with DMNQ 0.15  $\mu$ M, Homocysteine 100  $\mu$ M, Hydrogen peroxide 50  $\mu$ M, besides treatment with reducer agents TROLOX 500 Mm, TEMPOL 100 Mm, Ascorbic Acid 50  $\mu$ g/ml, NAC 30Mm, GSH 32Mm + BME 25 Mm. The presence of reactive species of oxygen (ROS) was evaluated, osteoclast differentiation was determined by Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining, resorptive activity and expression of osteoclastic markers. **Results:** PEG fusion results in ROS generation, increase in the TRAP + cells percentage, actin ring formation and resorbed area compared with non-treated cells. Treatment with oxidants on days 0 and 1 after PEG fusion results in increased levels of ROS, TRAP+ cells percentage, actin rings and bone resorption, treatment with reducers had an opposite effect decreasing these aspects; pretreatment with oxidants and reducers showed a decrease in bone resorption in both cases; otherwise oxidant and reducers applied on days 2 and 3 after PEG fusion did not show significative changes in bone resorption. **Conclusion:** Fusion itself implies ROS generation in turn increasing the expression of osteoclastogenic markers and resorptive activity, these characteristics are accentuated when applying oxidizing reagents, suggesting that the redox state of the cell is critical for survival, fusion stability and the beginning of the osteoclastogenic activity. **Key Words:** Bone resorption, macrophage fusion, osteoclast, activity, PEG, RANKL, antioxidants, oxidants, redox status.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>II</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Antecedentes del laboratorio .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Planteamiento del problema.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Pregunta de investigación .....</b>	<b>3</b>
<b>4. Justificación .....</b>	<b>3</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>4</b>
5.1 objetivo general .....	4
5.2 objetivos específicos.....	4
<b>6. Marco teórico.....</b>	<b>5</b>
6.1. Generalidades sobre metabolismo óseo .....	5
6.2. Hormonas, moléculas, y vías bioquímicas relacionadas con la proliferación celular	6
6.3. Hormonas, moléculas y vías bioquímicas relacionadas con la diferenciación celular	6
6.3.1 Mecanismos de fusión .....	8
6.3.1.1 DC–STAMP y OC–STAMP .....	8
6.3.1.2 CD47 .....	9
6.3.1.3 ERVW-1 .....	10
6.3.1.4 ADAM 12 .....	10
6.3.1.5 CDH1 .....	11
6.3.1.6 Cx 43 .....	11
6.3.2 Actividad osteoclástica.....	12
6.4. El proceso oxidativo celular en la actividad osteoclástica:.....	16
6.5. El proceso reductor celular en la actividad osteoclástica .....	21
6.6. Agentes reductores utilizados en el estudio de la actividad osteoclastogénica ..	27
6.8 Obtención de células similares a osteoclastos por fusión con PEG .....	32
<b>7. Métodos .....</b>	<b>35</b>
7.1 Elaboración de láminas de hueso .....	35

7.2 Cultivo celular.....	35
7.3 Fusión con PEG .....	35
7.4 Tratamiento con Agentes Reductores y Oxidantes .....	36
7.5 Ensayo de viabilidad .....	39
7.6 Evaluación de ROS .....	40
7.7 Tinción TRAP .....	40
7.8 Actividad resortiva .....	41
7.9 Inmunofluorescencia .....	42
7.9.2 Análisis estadístico .....	47
<b>8. Aspectos éticos .....</b>	<b>47</b>
<b>9. Propiedad intelectual.....</b>	<b>48</b>
<b>10. Resultados .....</b>	<b>49</b>
1. Los niveles de ROS se modifican con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG .....	49
2. El tamaño de la célula varía con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG. ....	55
3. La presencia de anillos de actina se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG. ....	61
4. La resorción se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG. ....	66
5. Los marcadores osteoclastogénicos se expresan de diferente manera con agentes oxidantes y reductores cuando son aplicados en etapas iniciales de la fusión con PEG.....	73
<b>11. Discusión.....</b>	<b>78</b>
<b>12. Conclusión .....</b>	<b>83</b>
<b>13. Aportes al conocimiento .....</b>	<b>84</b>
<b>14. Perspectivas.....</b>	<b>85</b>
<b>15. Bibliografía .....</b>	<b>86</b>
<b>16. ANEXOS.....</b>	<b>103</b>
1.1 Tablas de Resultados. ....	103
1.2 Fotografías de los Resultados. ....	111

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Fig. 1 Vías de señalización del osteoclasto.....	7
Fig. 2 La reacción Fenton y Haber Weiss generan radicales hidroxilo en la presencia de hierro. ....	15
Fig. 3 Vías metabólicas de las especies reactivas de oxígeno. ....	19
Fig. 4 Función antioxidante de GSH. ....	23
Fig. 5 Las enzimas citoprotectoras mediadas por Nrf2 disminuyen ROS. ....	24
Fig. 6 Reacción Fenton mediada por la vitamina C. ....	25
Fig. 7 Mecanismos antioxidantes del alfa tocoferol y el ácido ascórbico. ....	26
Fig. 8 TEMPOL aumenta la relación NAD + / NADH.....	28
Fig. 9 Estructura y mecanismo de acción de DMNQ.....	31
Fig. 10. Mecanismo de fusión con PEG.....	34
FIGURA 1. Los niveles de ROS se modifican con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.....	54
FIGURA 2. El tamaño de la célula varía con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.....	60
FIGURA 3. La presencia de anillos de actina se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen en relación con la fusión con PEG.....	65
FIGURA 4. La resorción se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen en relación con la fusión con PEG.....	72
FIGURA 5. Los marcadores osteoclastogénicos se expresan de diferente manera con agentes oxidantes y reductores cuando son aplicados en etapas iniciales de la fusión con PEG.....	77

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
7.4.1 TABLA.1 Caracterización de concentraciones de agentes oxidantes y reductores en osteoclastos. ....	37
7.9.1 TABLA 2 Caracterización de proteínas del osteoclasto para Inmunofluorescencia (con FITC).....	43
1.1 NO PEG vs PEG y PEG vs agentes oxidantes. ....	50
1.2 PEG vs agentes reductores. ....	50
1.3 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados 1 día después de la fusión con PEG. ....	51
1.5 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG. ....	52
Tabla 2. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la generación de células multinucleadas TRAP positivas. ....	55
2.1 NO PEG vs agentes oxidantes y reductores. ....	55
2.2 NO PEG vs PEG, PEG vs agentes oxidantes. ....	56
2.3 PEG vs agentes reductores. ....	56
2.4 PEG vs agentes oxidantes aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.....	57
2.5 PEG vs agentes reductores aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.....	58
2.6 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG. ....	58
Tabla 3. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la cantidad de osteoclastos que generan anillos de actina. ....	62
3.1 NO PEG vs PEG, PEG vs agentes oxidantes aplicados en el día 0, 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.....	62
3.2 PEG vs agentes reductores. ....	62
3.3 PEG vs agentes reductores aplicados en el día 1, 2 o 3 después de la fusión con PEG.....	63
3.4 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG. ....	63
Tabla 4. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la resorción ósea.....	67

---

4.1	NO PEG vs PEG, PEG vs agentes oxidantes y reductores. ....	67
4.2	PEG o PEG + agentes oxidantes aplicados en el día 0 vs agentes oxidantes aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG. ....	68
4.3	PEG o PEG + agentes reductores aplicados en el día 0 vs agentes oxidantes aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG. ....	69
4.4	PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG. ....	70
	Tabla. 5 Lista de marcadores osteoclásticos analizados y su función. ....	73
	Tabla 4. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la resorción ósea. ....	109

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### SIMBOLOS

<b>Símbolo</b>	<b>Definición</b>
M	Molar
L	Litro
g	Gramo
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ g	Microgramo
mL	Mililitro
mg	Miligramo
mm	Milímetros
rpm	Revoluciones por minuto
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
Tm	Temperatura

## ABREVIATURAS

### **Abreviatura**    **Significado**

NF $\kappa$ 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 metaloproteinasa 12.</i>
CDH1	<i>Cadherina 1/ E-Cadherina.</i>
Cx 43	<i>Conexina 43/ proteína de unión gap alfa 1.</i>
TRAP	<i>Fosfatasa ácida tartrato resistente.</i>
CTSK	<i>Catepsina K.</i>
MMP9	<i>Metaloproteinasa 9.</i>
ATPvaA1	<i>ATPasa vacuolar tipo H<sup>+</sup>.</i>
CA2	<i>Anhidrasa Carbónica II</i>
CD61	<i>Integrina Beta 3.</i>
VDAC1	<i>Canal selectivo de aniones voltaje dependiente 1.</i>
CTR	<i>Receptor de calcitonina.</i>
NOX4	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa 4/ NADPH Oxidasa 4.</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno.</i>
MCSF	<i>Factor estimulante de colonias macrófago.</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>
PBMC	<i>Célula mononuclear de sangre periférica.</i>
BMMS	<i>Macrófagos derivados de médula ósea.</i>

DMNQ	<i>2,3-Dimetoxi-1,4-naftoquinona.</i>
HCY	<i>Homocisteína.</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>Peróxido de hidrógeno.</i>
A.A	<i>Ácido ascórbico.</i>
TROLOX	<i>6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-acido carboxílico.</i>
GSH+BME	<i>Glutación reducido+ betamercapto etanol.</i>
NAC	<i>N – Acetil cisteína.</i>
TEMPOL	<i>4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxil.</i>
h.p.f	<i>Horas post fusión.</i>



# 1. Antecedentes del laboratorio

En el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, a partir de la teoría de que la fusión celular es esencial para la función del osteoclasto y su rol en el mantenimiento del control de la masa ósea y osteoclástica, se desarrolló un modelo para la obtención de células similares a osteoclastos que son capaces de realizar resorción, utilizando polietilenglicol (PEG).

El desafío surge por la imposibilidad de crear una línea celular osteoclástica, ya que estas células al estar en fase G0 no proliferan, por lo cual los métodos actuales para la obtención de osteoclastos constituyen la diferenciación de monocitos a través de cambios en el pH (ácido), aplicación conjunta del factor estimulante de colonias macrófago (MCSF) y el ligando para el receptor activador del factor nuclear  $\kappa$  B (RANKL), donde RANKL se ha identificado como el efector de la expresión específica de genes osteoclastogénicos, y cocultivos, donde osteoblastos principalmente y otros tipos de células, liberan RANKL para que se induzca diferenciación de los monocitos. Se demostró que la aplicación de PEG en monocitos (línea celular U937 o monocitos de sangre periférica extraídos de sujetos sanos - CMNSP) genera fusión, y que este evento es suficiente para la expresión de genes específicos del Osteoclasto, comparable con los inducidos por la aplicación de MCSF y RANKL, entre los que se encuentran enzimas pro resortivas como la Fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) y Catepsina K (CTSK), además de marcadores específicos de osteoclastos como la Anhidrasa carbónica II (CAII), el receptor de calcitonina (CT) y la ATPasa Vacuolar (V-ATPase A1); estas células similares a osteoclasto generan lagunas de resorción cuando son sembradas sobre hueso, que no fueron observadas cuando las células no fueron sembradas o cuando se utilizaron células provenientes de otros linajes (fibroblastos) aun cuando fueron fusionadas con PEG.

Esto constituye un método sencillo para reemplazar los cocultivos y además permite obtener células multinucleadas que podrían ser usadas para estudios bioquímicos relacionados a mecanismos básicos que conciernen a la fusión de macrófagos para la obtención de osteoclastos, su actividad resortiva y la búsqueda experimental para alternativas terapéuticas (1-3).

## **2. Planteamiento del problema**

Las especies reactivas de oxígeno –ROS- causan estrés oxidativo en la célula que tiene efectos deletéreos sobre ésta generando apoptosis, sin embargo, en estudios previos se ha mostrado que en concentraciones indicadas no son tóxicas y tienen un rol como segundo mensajero, por ejemplo, en osteoclastos, ROS regula las vías de señalización inducidas por RANKL requeridas para su diferenciación, pero es aún incierto si ROS está implicado directamente en la función resortiva del osteoclasto (4,5).

En el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, se desarrolló un modelo para estudiar directamente la actividad resortiva de células similares a osteoclastos, obtenidas a partir de fusión de células de origen monocito-macrófago (U937 humanas o CMNSP) con PEG (1-3). El propósito de este trabajo es investigar los cambios en la actividad osteoclastogénica al aplicar distintos agentes oxidantes y reductores, a células fusionadas con PEG. Es necesario determinar si la actividad osteoclastogénica desencadenada por la fusión con PEG se modifica al tratar las células con agentes reductores u oxidantes antes o después de la fusión con PEG. Los resultados del presente trabajo permitirán deducir si la condición oxidativa o reductora de la célula altera la actividad osteoclástica. Específicamente, facilitará inferir qué tan fuerte es el papel de la fusión en desencadenar los mecanismos bioquímicos implicados con la resorción a pesar que la célula se trate con agentes reductores u oxidantes antes de fusionar con PEG y qué tanto se modifican al adicionar los mismos reactivos luego de la fusión. Estos cambios serán evaluados analizando los niveles de ROS, la actividad TRAP, la actividad resortiva y los marcadores de membrana citoplasmática. Luego, permitirá especular 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.

### **3.Pregunta de investigación**

¿Al alterar los mecanismos oxido-reductores de la célula se modifica la actividad osteoclástica, en células U937 fusionadas con polietilenglicol?

### **4.Justificación**

El modelo desarrollado en el laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional, consistente en fusionar células con PEG, observándose que dicha fusión induce actividad osteoclastogénica se interpreta como el estadio posterior a la proliferación que ejerce el (M-CSF) y de diferenciación, ejercido por RANKL; es decir, al fusionar las células con PEG es equivalente a saltar los eventos bioquímicos que llevan a cabo M-CSF y RANKL en el precursor osteoclástico. Al parecer la fusión *per sé* induce eventos bioquímicos propios de una célula osteoclástica diferenciada a juzgar por la actividad TRAP, resorptiva y la aparición de marcadores en membrana citoplasmática característicos de los osteoclastos sin que al cultivo se le adicione M-CSF o RANKL (1-3). La investigación del papel de las especies reactivas de oxígeno –ROS- en el metabolismo óseo se limita al estudio durante las fases de proliferación y diferenciación de los precursores osteoclásticos. Se han descubierto varias vías de señalización implicadas en la regulación de la cantidad de estrés oxidativo por parte del precursor osteoclástico para generar el ambiente óptimo que permita su diferenciación hacia osteoclasto donde la prevalencia de un ambiente oxidante es necesario (4-13); no obstante, permanece incierto el papel y la importancia de ROS durante la actividad del osteoclasto ya maduro y activo. Por esta razón, este trabajo contribuirá al entendimiento del papel del estado oxido-reductor en la actividad osteoclástica de células ya fusionadas o si al alterar este estado antes o después de la fusión modifica la actividad osteoclástica. Es decir, permitirá discriminar si el estado oxido-reductor es determinante en la actividad del osteoclasto o si lo es la fusión de las células o si juntos están coordinados.

## **5.Objetivos**

### **5.1 objetivo general**

Analizar cambios en la actividad osteoclástica al aplicar agentes reductores u oxidantes en células fusionadas con PEG.

### **5.2 objetivos específicos**

1. Evaluar la actividad osteoclástica en células U937 fusionadas con PEG y tratadas con agentes reductores TROLOX 500 $\mu$ M, TEMPOL 100 $\mu$ M, Ácido Ascórbico 50 $\mu$ g/ml, NAC 30mM, Glutación 32mM + BME 25 $\mu$ M o con agentes oxidantes DMNQ 0.15 $\mu$ M, Homocisteína 100 $\mu$ M, Peróxido de hidrógeno 50 $\mu$ M.
2. Determinar la etapa de la diferenciación o de la actividad osteoclástica en la que es esencial ROS para dichos procesos.
3. Evaluar la expresión de las proteínas de diferenciación: NF $\kappa$ B, NFATc1; de fusión: ERVW-1, CD47, DC STAMP, OC STAMP, ADAM 12, CDH1, Cx 43; de Actividad resorptiva: TRAP, CTSK, MMP9, ATPvA1, CA2,  $\alpha$ V $\beta$ 3; y otros: VDAC1 y CT; NOX y presencia de ROS en células U937 fusionadas con PEG y tratadas con agentes reductores u oxidantes que mostraron mejor y menor eficacia en alterar la resorción ósea.

## **6. Marco teórico**

### **6.1. Generalidades sobre metabolismo óseo**

El hueso como tejido conectivo especializado, tiene funciones que varían desde el soporte y protección de órganos vitales, hasta el mantenimiento de la homeostasis sérica la cual hace parte de un amplio proceso metabólico que es esencial para la vida (14). Éste tejido debe responder a los cambios en el medio ambiente, de manera tal que desde el nacimiento hasta el envejecimiento y en procesos como el crecimiento, renovación y reparación ocurre el remodelado óseo, en el que el hueso viejo es reemplazado por hueso nuevo. Es decir, es una estructura dinámica cuya homeostasis compleja, depende en parte, del acoplamiento correcto de las funciones de los distintos tipos celulares; los osteoblastos, células formadoras de hueso que trabajan en grupos para segregar y mineralizar la matriz ósea; los osteocitos quienes componen la matriz ósea, favorecen la nutrición y la estabilidad del hueso y finalmente los osteoclastos, células responsables de la resorción del hueso. En circunstancias normales la resorción, generada por los osteoclastos, es equivalente a la formación ósea, por los osteoblastos, de tal forma que se mantenga constante el volumen y masa del hueso, luego una de las problemáticas más importantes se observa en cómo el aumento de la resorción ósea se da sobre la aposición de hueso nuevo, generando una pérdida de masa ósea por la hiperactividad osteoclástica comparada con la actividad osteoblástica (15).

Los osteoclastos son células multinucleadas de gran tamaño, que se encuentran sobre la superficie del hueso y cuya función principal es la resorción del hueso; estas células son de origen hematopoyético que surgen como resultado de la diferenciación de células precursoras que tras un proceso de fusión – multinucleación-, maduran y se convierten en osteoclastos activos con capacidad resortiva, ya que pueden disolver la matriz inorgánica de hidroxapatita cristalina y degradar la matriz orgánica ósea la cual es rica en fibras colágenas (16).

## **6.2. Hormonas, moléculas, y vías bioquímicas relacionadas con la proliferación celular**

El linaje osteoclástico proviene de la célula madre hematopoyética, que dependiendo del estímulo con el que sea tratada tomará la vía mieloide o linfoide; para este caso, es de interés la línea mieloide donde comienza su diferenciación hacia célula progenitora mieloide adulta (CMP) que responde a factores estimuladores de colonias granulocito – macrófago (GM-CSF) secretado por fibroblastos, así se activará el factor de transcripción específico para linfocitos T y monocitos, generando la unidad formadora de células granulocito – macrófago (CFU-GM); en esta etapa la célula comenzará a perder su potencial proliferativo, cuando es estimulada por M-CSF e interleuquina 3 (IL3), se diferencia hacia monocitos que posteriormente pueden diferenciarse en otros tipos celulares, en este caso es de interés la diferenciación hacia osteoclastos (17).

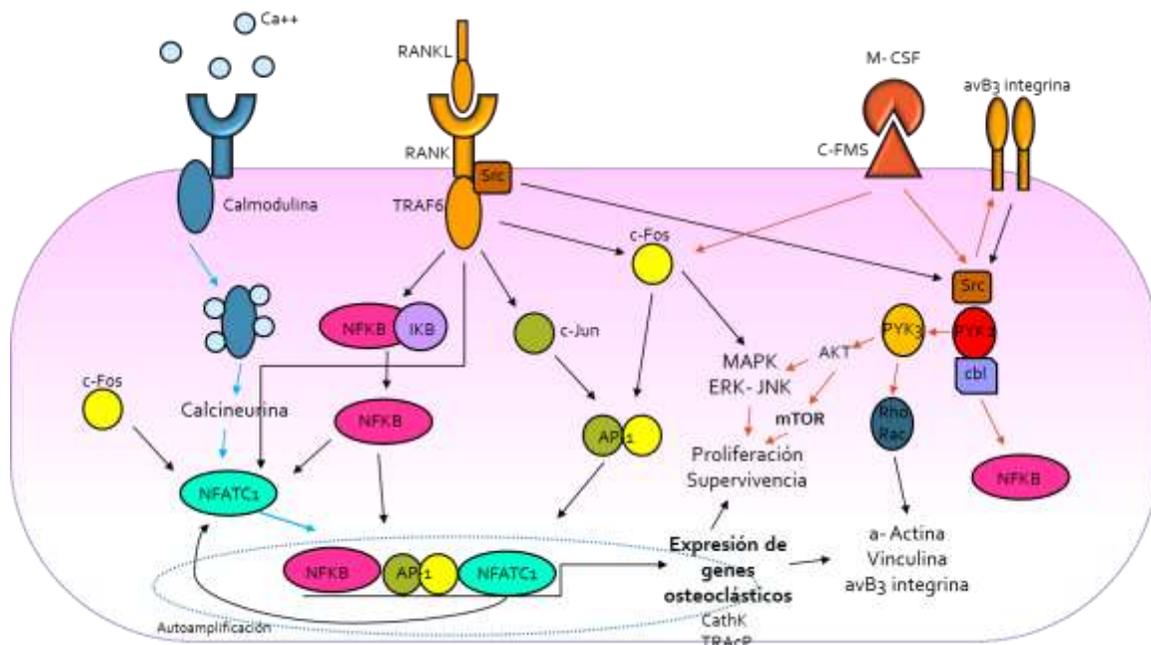
M-CSF tiene un rol importante en la proliferación y supervivencia de monocitos precursores de osteoclastos. Por un lado, la unión de MCSF con su receptor c-Fms genera la fosforilación de tirosinas en la porción citoplasmática de c-Fms, estas son capaces de interactuar con proteínas como la tirosin protein kinasa oncogénica (c-Src), esto recluta a la fosfatidilinositol 3 kinasa (PIK3) quien a su vez activa a la protein kinasa B (Akt), por otro lado la fosforilación de c-Fms activa a la proteína asociada a receptores de crecimiento (Grb2) que funciona como un adaptador; ambos Akt y Grb2, terminarán en la activación de kinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) conocidas por activar proteínas G pequeñas y factores de transcripción que median la síntesis de proteínas implicadas en proliferación y supervivencia como las ciclinas, entre otras (18,19).

## **6.3. Hormonas, moléculas y vías bioquímicas relacionadas con la diferenciación celular**

El estímulo continuo de M-CSF genera únicamente diferenciación de monocitos hacia macrófagos, sin embargo, se sabe que estos expresan el receptor RANK cuya interacción con el ligando para el receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B -RANKL- genera una cascada de señalización que produce la expresión de genes específicos del osteoclasto. La interacción RANK – RANKL genera trimerización de RANK, y así éste pueda interactuar con

los receptores asociados al factor de necrosis tumoral (TRAF), específicamente a TRAF2, TRAF5 y TRAF6, que reclutarán distintas proteínas, entre ellas las protein kinasas activadas por mitógenos (p38), c-Src, PI3K y AKT que en este caso mediarán la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B); el factor de transcripción proteína activadora 1 (AP1) y el factor nuclear de activación para células T citoplasmático 1 (NFATc1), tres factores de transcripción implicados en la salida del ciclo celular y el compromiso del monocito a pre osteoclasto y osteoclasto (18-27). Se sabe sin embargo que RANK tiene la capacidad de realizar un autoensamblaje a través de la interacción de sus dominios citoplasmáticos localizados en las posiciones 534–539 de la proteína, y que la sola oligomerización de RANK es suficiente para producir osteoclastogénesis de manera independiente del ligando, de igual forma sucede a través de la interacción con las proteínas efectoras TRAF (22).

**Fig. 1 Vías de señalización del osteoclasto**



**Fuente:** Elaboración propia

RANKL y MCSF provenientes de osteoblastos y osteocitos, generan la activación de los receptores RANK y C-FMS en los osteoclastos. El primero generando una cascada de señalización a través de la interacción con TRAF6 que libera a NF $\kappa$ B de su porción inhibitoria

permitiendo la translocación de éste al núcleo para que ejerza su función como factor de transcripción, paralelamente TRAF6 (23) genera la activación y dimerización de c-jun y c-fos para formar el factor de transcripción AP1 y su translocación al núcleo, también genera la activación y translocación de NFATc1 que puede ser independiente de RANKL -dependiendo del aumento del flujo del calcio intracelular-. Los tres factores de transcripción son necesarios para la expresión de genes osteoclastogénicos que permiten la fusión – reorganización del citoesqueleto y formación de enzimas y otras proteínas requeridas para la resorción, por su parte M-CSF mantiene la proliferación y viabilidad de la célula (18-27). Luego M-CSF actúa como un factor de supervivencia en los progenitores tempranos, mientras que RANKL -RANK provee la señal clave para el compromiso con el linaje osteoclástico.

### **6.3.1 Mecanismos de fusión**

El primer paso en la diferenciación del precursor osteoclástico es la regulación positiva de proteínas implicadas en la fusión, sin embargo, es muy importante recalcar que se requiere de la heterogeneidad de los compañeros de fusión con respecto a los niveles de expresión de las distintas proteínas fusogénicas (28-30).

#### **6.3.1.1 DC–STAMP y OC–STAMP**

Las proteínas transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) y transmembrana estimuladora de osteoclastos (OC–STAMP), son proteínas específicas del linaje osteoclástico, ambas corresponden a receptores en la membrana celular que, aunque sus ligandos son desconocidos, funcionan de una manera similar, el estímulo con RANKL genera la disminución de los niveles de estas proteínas en la membrana, sin embargo, aumenta dramáticamente su expresión (31).

Sin estímulo, ambos receptores mantienen secuestradas las tirosin fosfatasas con dominio homólogo a Src (SHP) cuya función es la de activar pequeñas GTPasas RAS para la regulación de la señalización del calcio a través de la fosfolipasa C, los niveles altos de calcio estimulan la auto amplificación de la transcripción de NFATc1 para la posterior expresión de genes osteoclastogénicos, por lo cual el estímulo de RANKL y la subsecuente

internalización de DC-STAMP y OC-STAMP generan la liberación de SHP regulando positivamente la señalización mediada por calcio (31-34).

Por otra parte, DC-STAMP y OC-STAMP pueden interactuar inhibiendo a las kinasas de adhesión focal (FAK) estas kinasas activan a c-Src cuya función también es activar GTPasas Rac necesaria en la polimerización de actina para generar adhesión y migración; luego la internalización de los receptores genera una cascada de señalización que facilita la movilidad de los precursores osteoclásticos estimulados; estas células activas se han denominado como iniciadores, los cuales interactúan con otros precursores para comenzar el proceso de fusión (31-34), es interesante también recalcar que los precursores osteoclásticos que se encuentran activos por una previa estimulación de RANKL pueden interactuar con células que no han sido estimuladas y fusionarse con ellas para generar osteoclastos (30).

Los altos niveles en la transcripción de DC-STAMP y OC-STAMP se asocian como un mecanismo regulatorio, porque la delección de ellos causa un bloqueo de la formación de osteoclastos *in vitro*, por lo cual, principalmente DC-STAMP es indispensable para la fusión celular (31).

### **6.3.1.2 CD47**

La proteína asociada a integrinas (CD47) tiene capacidad de interactuar con integrinas y con la proteína reguladora de señales (SIRP $\alpha$ ), esta interacción genera en la célula la activación de pequeñas GTPasas Rho cuya función principal es la de activar otras proteínas encargadas de la polimerización de los anillos de actina para facilitar la movilidad de la célula. Por su parte, SIRP $\alpha$  que se encuentra en la membrana de la célula contraria activa su motivo inhibitorio basado en tirosina (ITIM) que bloquea la activación de las SHP inhibiendo a su vez la polimerización de la actina sirviendo entonces como una célula donante (35,36). La interacción de estas dos células inicia la fusión generando osteoclastos pequeños de dos núcleos, sin embargo, la función de CD47 en células ya fusionadas es adicionar células individuales (37).

### 6.3.1.3 ERVW-1

La Sincitina1 (ERVW-1) es una glicoproteína que se compone de 2 subunidades, una de superficie (SU) y una transmembrana (TM), la primera media el reconocimiento al receptor transportador neutral de aminoácidos (ASCT1), y la unidad trans membrana contiene un péptido de fusión; durante la fusión entre las células, una estructura de la unidad TM en forma de espiral, asume una estructura trimérica en forma de horquilla, que se pliega con el fin de acercar las membranas posicionando el péptido de fusión en proximidad a la región C terminal de ASCT1, el acercamiento entre las membranas disminuye la energía libre necesaria para superar las barreras para unirse facilitando la unión con otras proteínas encargadas de la fusión de membranas *per sé* (38).

ERVW-1 ha mostrado un papel en la reducción del número de osteoclastos pequeños multinucleados, fusionándolos entre sí con el fin de generar osteoclastos más grandes con mayor cantidad de núcleos (36); para que esto suceda el patrón de ERVW-1 en la membrana debe ser distinto entre los compañeros de fusión, ya sea porque una célula contiene ERVW-1 y la otra no, o porque ERVW-1 de una célula se polariza al lado opuesto de la zona de contacto con otra célula rica en ERVW-1. A mayor cantidad de fusión hay mayor presencia de la sincitina1 en la superficie de la célula, esto también puede ser un mecanismo regulatorio del tamaño, pues cuando la célula haya alcanzado un nivel óptimo de fusión, la superficie rica en ERVW-1 no permitirá la adición de nuevas células (36,39,40).

### 6.3.1.4 ADAM 12

La desintegrina y metaloproteínasa 12 (ADAM12), tiene capacidad de interacción con integrinas y se considera como una molécula que participa en la fusión de las membranas. Inicia la fusión por unión con la integrina  $\alpha 9 \beta 1$  de otra célula modificando el citoesqueleto (41), similar a ERVW-1 contiene un motivo de estructura parecida a los péptidos de fusión en su dominio rico en cisteína, lo cual le permite generar un plegamiento que acerca las membranas de ambas células entre sí, se sabe que en osteoclastos hay una regulación positiva del mRNA de ADAM12 en etapas tempranas, el cual disminuye drásticamente a medida que las células mononucleadas comienzan a fusionarse y a formar células multinucleadas, dándole un papel relevante a la fusión únicamente entre precursores osteoclásticos (42).

### **6.3.1.5 CDH1**

La E cadherina (CDH1) tiene capacidad de unión a otras cadherinas, la porción citoplasmática de CDH1 una vez activada, recluta a la proteína catenina que a su vez interactúa directamente con forminas; estas proteínas –forminas- se encuentran implicadas en la polimerización de la actina asociándose con los filamentos de actina. Dichas proteínas tienen dominios de unión a pequeñas GTPasas Rho, por lo cual la interacción entre cadherinas ejerce un efecto similar al de CD47 en la modificación del citoesqueleto (43). La expresión de CDH1 aumenta con el estímulo de RANKL, sin embargo, disminuye de manera tiempo dependiente, es así como se ha observado que su presencia persiste únicamente en pre osteoclastos y osteoclastos pequeños -de 1 a 3 núcleos-, y fue sustancialmente reducida en osteoclastos multinucleados de mayor tamaño que coincidía con un aumento en la expresión de NFATc1 (44).

### **6.3.1.6 Cx 43**

La proteína de unión Gap Alfa 1 o conexina 43 (Cx43), es uno de los componentes de las uniones gap, las cuales permiten la comunicación intercelular directa por la difusión de iones, metabolitos y pequeñas moléculas solubles incluyendo calcio y ATP, regulando distintas funciones (45).

Luego de la activación de RANKL, la fosforilación de AKT genera el tráfico de los monómeros de Cx43 desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi, una vez ensamblado el canal, la fosforilación de PKA genera el tráfico hacia la membrana celular, allí interactúa con otras conexinas para formar lo que se denomina el poro de fusión, formado el primer poro, distintas kinasas como Src, MAPKs, ERK y PKC regulan la degradación de los canales viejos con el fin de ensanchar el poro a medida que las membranas entran en proximidad (45).

Cx43 se ha visto implicado en la fusión de precursores osteoclásticos, se sabe que la expresión de Cx43 aumenta por la activación con RANKL, sin embargo, se encuentra relacionado principalmente con pre osteoclastos y osteoclastos pequeños, mostrando una disminución de la expresión en osteoclastos de gran tamaño, por lo cual su presencia es inversamente proporcional al nivel de multinuclearidad, esto también dado a que tiene una

vida media corta de aproximadamente solo 4 horas -lo suficiente para permitir la interacción entre las membranas y formar el poro de fusión que posteriormente se ensanchará- (46-48).

En resumen, la fusión de los osteoclastos ocurre gracias a que distintas proteínas interactúan aproximando las membranas celulares de una forma íntima, de manera tal que pueda formarse el poro de fusión a través de la conexina y fusionar así las membranas y el citoplasma; así mismo este proceso se encuentra regulado estrictamente entre compañeros de fusión y con el fin de lograr un tamaño determinado.

La fusión celular se ha logrado identificar entonces como un proceso de cuatro etapas (28):

1. Movilización del osteoclasto donante hacia el osteoclasto receptor.
2. Formación de un podosoma por parte de la célula donante que busca la formación de una superficie de contacto ancha entre las membranas celulares inmediatamente previa a la fusión.
3. Formación de una copa fagocítica, donde el osteoclasto receptor envuelve al osteoclasto donante en una estructura similar a la que se forma en un proceso de fagocitosis.
4. Cuando las células se están fusionando, dentro de la célula receptora se encuentran estructuras similares a tubos, la célula forma estructuras similares que se unen entre sí.

### **6.3.2 Actividad osteoclástica**

Una vez el osteoclasto se ha fusionado comienza una segunda etapa en la que comienza la transcripción de proteínas necesarias para su función, entre ellas una gran variedad de enzimas que se encargan de degradar la matriz orgánica e inorgánica (49-53); en etapas tardías post fusión RANKL genera estructuras necesarias para la resorción a través de la activación de TRAF6 directamente ya que éste media la activación de c-Src y la fosforilación de c-Cbl, que tienen roles en la resorción debido a que activan GTPasas encargadas de la reorganización del citoesqueleto, que es necesaria para generar podosomas y anillos de actina que funcionan como medio de unión con la matriz ósea de manera tal que se cree una zona de sellado donde se realiza la resorción, por otro lado, interviene en la formación del borde en cepillo por donde se dará la secreción de enzimas e hidroxilo que modifican el pH de lo que se llamará la laguna de resorción. Se ha encontrado que el bloqueo en la función

de TRAF6 en osteoclastos maduros, afecta el ensamblaje del borde en cepillo y la exocitosis necesarias para la resorción de los osteoclastos (23). La unión a la matriz ósea se da gracias a la integrina alfa beta 3 ( $\alpha_v\beta_3$ ), esta integrina posee una porción citoplasmática que se encuentra anclada al citoesqueleto y genera vías de señalización dependientes de c-Src y Pyk2, la porción extracelular tiene capacidad de unirse a una variedad de proteínas de la matriz extracelular como la vitronectina, la osteopontina y la sialoproteína ósea, generando así una íntima adherencia al hueso (48).

Una vez formado el borde en cepillo el primer paso en la resorción ósea es la disolución de la hidroxiapatita que ocurre al formar ácido clorhídrico en presencia protones de hidrógeno y cloro liberados por las vesículas provenientes del aparato de Golgi a través del borde en cepillo a manera de inyección; el ácido clorhídrico formará gran parte de la laguna de resorción entre la membrana del borde en cepillo y la matriz ósea (49-53).

A partir de dióxido de carbono y agua, la anhidrasa carbónica citoplasmática II (**CA2**), genera una reacción que libera protones de hidrógeno y bicarbonato, ambos son expulsados por la célula a través de la ATPasa vacuolar (**ATPv**), esta bomba de proteínas utiliza la hidrólisis del ATP para crear un gradiente de concentración acidificando el medio extracelular en un pH aproximado a 4.5. Sin embargo, los hidrogeniones y los ambientes ácidos también se requieren en distintos organelos, como en vesículas lisosomales, generalmente la ATPv se ubica en la posición condensada en el anillo de actina pues se encuentra anclada a los microfilamentos (49). El exceso de bicarbonato citoplasmático se remueve gracias a un intercambio de cloro–bicarbonato en la membrana basolateral manteniendo la homeostasis de la célula (16,20).

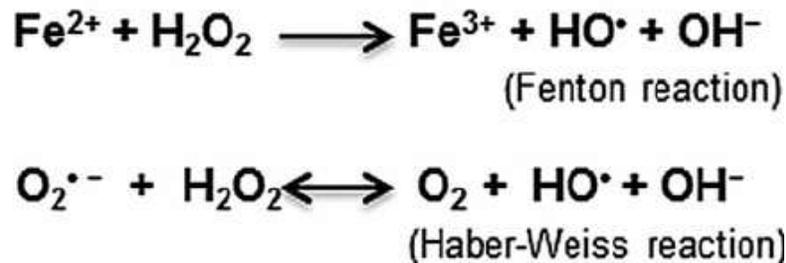
Una vez degradada la matriz inorgánica, enzimas proteolíticas se encargan de degradar la porción orgánica, de tal forma que:

La catepsina K (**CTSK**), es una enzima de tipo cisteína proteasa, esta enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos a través de la deprotonación de su grupo tiol en el sitio activo de la enzima, esta enzima se expresa en osteoclastos y se secreta por el borde en cepillo de la membrana, también puede ser encontrada en vesículas intracelulares de la ruta transcitótica; sus principales sustratos son los colágenos tipo I y II y la osteonectina, sin embargo su importancia radica en que es una enzima que funciona a pH ácido de aproximadamente 5, y además es capaz de activar otras enzimas proteolíticas (50).

La metaloproteinasa 9 (**MMP9**) (51), pertenece al grupo de metaloproteinasas de la matriz, que es una familia de endopeptidasas dependientes de zinc cuya función es hidrolizar el enlace peptídico de distintas proteínas, la MMP9 tiene un dominio catalítico para la fibronectina que es capaz de realizar proteólisis de colágeno tipo IV y V (52), no obstante la MMP9 en osteoclastos es liberada como una enzima inactiva, proMMP9, donde una cisteína se une al átomo de zinc en el sitio activo manteniéndola en un estado de latencia, para que la MMP9 se active requiere de la interrupción de esta interacción, en osteoclastos se ha demostrado que la responsable de este clivaje es la CTSK (53).

La fosfatasa ácida tartrato resistente (**TRAP**), es un polipéptido que se sintetiza con una baja actividad enzimática, el clivaje en una región expuesta convierte la proteína en una forma que contiene 2 subunidades que es catalíticamente activa. La CTSK también es responsable del clivaje y consecuente activación del TRAP monomérico (50), es secretada por los osteoclastos durante la resorción ósea a través de los lisosomas que se encuentran en las vacuolas resorptivas en el borde en cepillo; *in vitro*, TRAP es capaz de hidrolizar varios sustratos incluyendo nucleótidos, fosfatos y fosfoproteínas como la osteopontina pero su actividad ocurre únicamente en ambientes ácidos (54). La porción catalítica tiene un cluster di-iron-oxo, esto quiere decir un ligando tipo oxo, éste es un átomo de oxígeno unido a uno, o más centros metálicos -en este caso hierro-, estos grupos son altamente reactivos y son capaces de abstraer átomos de hidrógeno de enlaces saturados con carbonos, siendo capaces de oxidar grupos alquilo directamente a alcoholes sin pasar por la formación de un ácido carboxílico, así como también tienen capacidad de oxidar grupos aromáticos transfiriendo un átomo de oxígeno; ya que se encuentra en la subunidad catalítica estas oxidaciones son químicamente selectivas y tienen lugar en medios acuosos, no obstante se ha identificado que los átomos de hierro en las moléculas pueden disociarse y formar radicales libres por la reacción fenton (55,56). Esta reacción ocurre cuando un átomo de hierro, en este caso unido a TRAP en condiciones ácidas interactúa con una molécula de peróxido de hidrógeno, el hierro se oxida generando entonces dos moléculas radicales hidroxilo, adicionalmente se puede dar la reacción de *Haber Weiss* que ocurre cuando un superóxido entra en contacto con peróxido de hidrógeno y produce radicales hidroxilo; estas moléculas son altamente reactivas y tienen alta capacidad oxidativa pudiendo alterar fácilmente a los enlaces de otras moléculas (57).

**Fig. 2 La reacción Fenton y Haber Weiss resultan en la generación de radical hidroxilo en la presencia de hierro.**



**Fuente:** Singh N. Brain iron homeostasis. *Antioxid Redox Signal*. 2014 (58).

Los metales activos como el hierro y el cobre son necesarios para la función celular porque participan en la transferencia de electrones pues sirven como cofactores para enzimas, sin embargo, el hierro libre puede reaccionar con oxígeno molecular, para generar radicales hidroxilo y aniones hidroxilos, para este caso causan oxidación de aminoácidos deaminándolos y contribuyendo así a la degradación de las proteínas (58).

Los productos de la degradación son removidos por medio de una transcitosis vesicular desde el borde en cepillo hasta al dominio secretorio funcional donde se liberan en el espacio extracelular (16). Dentro de estas vesículas TRAP produce especies reactivas de oxígeno que en conjunto con la presencia de **MMP9** y **CTSK** finalizan la degradación de los productos de resorción (56), aquí un intercambiador de cloro-bicarbonato, normaliza el pH dentro de la célula y de las vesículas, por tanto, del material expulsado y cuando el osteoclasto termina de realizar su función, algunos autores sugieren que se moviliza a un segundo sitio para continuar la resorción (20).

No obstante, para confirmar el linaje osteoclástico, dado que algunas células como las células gigantes multinucleadas provenientes de macrófagos poseen algunas de estas proteínas, se han utilizado marcadores específicos como el receptor de calcitonina (**CTR**) que el osteoclasto utiliza como sensor de los niveles de calcio en sangre y (**VDAC1**) como canal de cloro que también ha mostrado un rol en la acidificación de las lagunas de resorción (59), sin embargo VDAC1 media la salida del anión superóxido desde la mitocondria hacia el citoplasma (170).

Por la complejidad de lo anteriormente dicho, entender el proceso de diferenciación y actividad del osteoclasto es importante para estudiar las enfermedades que presentan características osteoporóticas, ya que ROS que se incrementa por varios factores como la edad, menopausia, estrés y estados inflamatorios, entre otros, regulan positivamente el proceso de diferenciación del pre osteoclasto hacia osteoclasto, activando distintas vías de señalización que facilitan su fusión y maduración, lo que resulta un aumento en la pérdida ósea (60-62).

## **6.4. El proceso oxidativo celular en la actividad osteoclástica:**

ROS, son un grupo de moléculas que se producen durante los procesos metabólicos de la célula cuyas reacciones requieren oxígeno, estas moléculas son productos de la cadena de transporte de electrones, sistemas de enzimas que utilizan oxígeno, peroxisomas y otros procesos aeróbicos, así como los procesos de peroxidación lipídica, los ROS son generalmente muy reactivos porque tienen electrones desapareados que son inestables y por lo tanto reaccionan con otras moléculas con el fin de estabilizarse al completar sus orbitas, el proceso de óxido reducción ocurre cuando los ROS que son agentes oxidantes tienden a captar electrones para reducirse y estabilizarse, mientras que los agentes reductores son los que ceden electrones para posteriormente convertirse en elementos oxidados (63).

Se consideran ROS, los productos de la reducción secuencial del oxígeno ( $O_2$ ), una reducción forma el Anión superóxido  $O_2^-$ , y el radical hidroperóxilo  $O_2H^\cdot$  una segunda reducción, forma el peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , y una tercera reducción produce el radical hidroxilo  $OH^\cdot$ , aunque también pertenecen al grupo de los ROS el óxido nítrico (NO) y el ácido nítrico  $HONO_2$  ( $HNO_3$ ) (59).

Los aniones superóxido  $O_2^-$  pueden formar  $H_2O_2$  y  $O_2$  por un proceso llamado dismutación, sin embargo, la enzima superóxido dismutasa SOD, acelera esta reacción, por lo cual la vida media típica del superóxido dentro de la célula es de menos de 1ms (59). El  $H_2O_2$  es una molécula más estable que se difunde fácilmente por la célula a través de acuaporinas, tiene una vida media de 1ms y viaja hasta una micra de distancia (62), por si solo puede causar reacciones de oxidación, pero puede generar  $OH^\cdot$  en presencia de metales de transición

como hierro y cobre por la reacción fenton, el OH<sup>-</sup> tiene una reactividad más alta, por lo cual su vida media es de nanosegundos luego no migra cuando se encuentra en solución afectando solamente las moléculas cercanas a su sitio de producción, no obstante estas tasas de vida media dependen de la cantidad de enzimas antioxidantes en el momento de la producción de ROS (59).

Su característica oxidante hace que estas moléculas, en exceso, representen un daño potencial para la célula, alterando el DNA, oxidando ácidos grasos y aminoácidos (63); este fenómeno se conoce como estrés oxidativo que hace que la célula cambie o pierda su función e incluso que genere apoptosis.

Sin embargo, ROS también tienen distintos roles en la fisiología celular, porque en general funcionan como un segundo mensajero que regula la diferenciación, proliferación y migración celular (64-66); por lo cual los mecanismos oxido reductores tienen un papel importante en mantener el equilibrio de ROS en la célula (66-73).

Los monocitos tienen la capacidad de fusionarse y dependiendo de los genes activados pueden convertirse en células gigantes multinucleadas del sistema inmune que no tienen capacidad resorptiva pero que igualmente expresan proteínas osteoclastogénicas como TRAP y cuya diferenciación también está mediada por la actividad de NFκB (1-3), o pueden fusionarse diferenciándose hacia osteoclastos que expresan proteínas que les permiten hacer resorción. Para la diferenciación de las células gigantes multinucleadas, hay evidencia de que su diferenciación también requiere de la generación de ROS, donde las nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (**NOX**) tienen un papel crucial, siendo NOX2 la predominante en células multinucleadas, a estos ROS se les ha dado gran importancia en el proceso de degradación de agentes patógenos; la expresión de NOX2, también resulta por la activación de NFκB, donde hay un mecanismo de feedback, donde NFκB regula positivamente NOX con la subsecuente producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que después activa a NFκB en las mismas células, lo que resulta en una producción sostenida de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (74).

Sin embargo, se ha encontrado una diferencia determinante entre las células gigantes multinucleadas y los osteoclastos y es que los niveles de NOX 2 expresados en osteoclastos son el doble que en los fagocitos (75), por lo cual sus niveles de ROS son más altos (76). Así mismo O<sub>2</sub><sup>-</sup> ha sido detectado en el borde en cepillo de los osteoclastos, lo que sugiere que

los ROS también son producidos en los sitios de resorción y que podrían participar en los procesos de degradación de la matriz a través de TRAP (74).

Sin embargo y de manera interesante a pesar de la delección de NOX2, los osteoclastos aún pueden diferenciarse y mantener niveles de ROS similares a los que ocurrirían en una situación normal, y esta capacidad ha sido atribuida a la mayor expresión de NOX4 (77), y NOX1 (78), ya que al inhibir cualquiera de los dos se inhibe la osteoclastogénesis, adicionalmente el rol de NOX1 y NOX4 en células gigantes multinucleadas no han mostrado un rol especial (79).

NOX son enzimas que se encuentran ancladas a la membrana celular y estimulan la producción de ROS inducida por ROS, NOX genera  $O_2^-$  por la transferencia de electrones desde el NADPH dentro de la célula, a través de la membrana y acoplándolos a un  $O_2$  para producir anión superóxido ( $NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^- + H^+$ ),  $O_2^-$  a su vez puede formar  $H_2O_2$  que tiene otras reacciones (66).

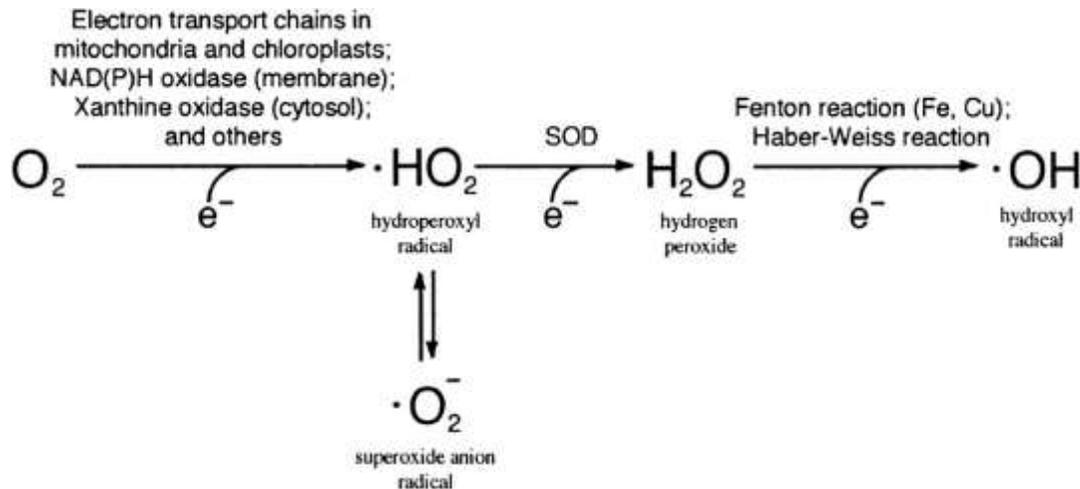
El peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  a su vez activa a otras NOX para que comiencen la producción de  $O_2^-$ ; por otra parte, el peroxinitrito desaparece también a las sintasas de óxido nítrico (**eNOS**), pasando de NO a  $O_2^-$ , lo que aumenta la producción de ROS mitocondrial, por otra parte, el  $H_2O_2$  induce la transformación de Xantina deshidrogenasa (XDH) en Xantina oxidasa (XO), que es otra fuente de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  (10,80).

En osteoclastos NOX1 aumenta su transcripción y se activa tras el estímulo por RANKL a través de una pequeña GTPasa Rac1 tras su activación por TRAF6, mientras que aunque NOX2 se encuentra en altos niveles, parece ser constitutiva, y su delección no afecta la diferenciación, como si sucede al suprimir NOX1; por otra parte las NOX3 y 4 no presentan niveles elevados, pero se ha observado que su delección produce fenotipos osteopetróticos porque hay una disminución en la cantidad de c-jun y JNK, proteínas importantes para la proliferación de precursores osteoclásticos, sin embargo ante la ausencia de una de estas dos, su función puede ser suplida por la otra (70-71).

Es importante tener en cuenta también que una de las fuentes más importantes de ROS durante el metabolismo celular es la de la mitocondria; la síntesis de ATP por la fosforilación oxidativa, es un proceso basado en la oxidación de productos de la glicolisis a través de la cadena de transporte de electrones. En algunos sitios de la cadena respiratoria algunos electrones son transferidos al  $O_2$  generando  $O_2^-$  en la matriz mitocondrial, y en el

metabolismo de la glucosa también es producido por la alfa cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, glicerol 3 fosfato deshidrogenasa y la beta oxidación de ácidos grasos (80), que representan las principales fuentes de ROS en condiciones fisiológicas.

**Fig. 3 vías metabólicas de las especies reactivas de oxígeno.**



**Fuente:** Adaptado de Mori IC. Reactive oxygen species activation of plant  $Ca^{2+}$  channels. Plant Physiol. 2004 (81).

Varias son las fuentes de ROS, entre ellas, algunas enzimas como NOX y XO, y otras como eNOS, además la liberación de electrones por la cadena de transferencia de electrones también constituye una fuente importante de ROS, lo que resulta en la generación de  $O_2^-$ ,  $O_2H^\cdot$ ,  $H_2O_2$  a través de SOD y  $OH^\cdot$  por la reacción Fenton, cada uno de ellos con una reactividad distinta (81).

A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual ROS media la diferenciación hacia osteoclastos, se ha demostrado en estudios previos que la generación de ambientes antioxidantes disminuyen la diferenciación de pre osteoclastos hacia osteoclastos, por lo cual se sugiere la importancia de ROS para este proceso (70-73); de igual forma el osteoclasto tiene mecanismos reguladores del estrés oxidativo que durante etapas tempranas de diferenciación han mostrado ser suprimidos para que el aumento de ROS sea suficiente para generar un estímulo pro osteoclastogénicos (82-84).

Estudios recientes sugieren que un ambiente oxidativo es necesario para la liberación de citoquinas como el grupo caja 1 de alta movilidad (HMGB1) que se ha identificado como una citoquina osteoclastogénica, ya que se puede unir a receptores para productos avanzados

de glicación (RAGEs) y receptores Toll like 2 y 4 (TLR2, TLR4) que también tienen capacidad de reclutamiento de TRAF que posteriormente inducirían la traslocación al núcleo NF $\kappa$ B con el fin de incrementar genes osteoclastogénicos de manera independiente a RANKL (85,86).

ROS actúa como un segundo mensajero en cascadas de señalización celular, la generación intracelular disparada por RANKL, genera activación de distintas MAPK como JNK, ERK y p38 a través de cambios en el estado de oxidación de grupos tiol y también porque la oxidación de SHP1 y c-Src genera una asociación entre ellas que permite la activación de c-Src para que esta a su vez active AKT y ERK (9), cuando las MAPK se encuentran activas incrementarán la salida de calcio del retículo endoplasmático con el fin de potenciar la vía de la calmodulina, JNK y p38 son activados en mayor medida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que ERK responde más a O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ambos de manera dosis dependiente. Todo lo anterior significa la auto amplificación de NFATC1 y la transcripción de los genes osteoclastogénicos a través del incremento en los niveles de calcio que activarán a la calmodulina–calcineurina (8), las MAPK también se encuentran implicadas en la activación de genes implicados en la supervivencia celular, sin embargo, la activación crónica de JNK y p38 genera señalización pro apoptótica que dispara activación de caspasas y disfunción mitocondrial, por lo que el osteoclasto tiene mecanismos regulatorios de ROS (87).

Una parte muy importante en la regulación de la osteoclastogénesis por ROS es la biogénesis mitocondrial para lo cual altas concentraciones de hierro son requeridas en la célula con el fin de sintetizar grupos heme en las proteínas de la cadena de electrones, además de servir como cofactor para TRAP, el hierro entra a través del receptor de transferrina 1 (TfR1), corriente arriba se encuentra la metaloreductasa antígeno epitelial de próstata 4 (STEAP4) esta enzima, que regula su expresión positivamente con el estímulo de RANKL, tiene la capacidad de reducir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup>, usando NAD<sup>+</sup> como aceptor, así es importante recordar que Fe<sup>2+</sup> es el que participa en la reacción Fenton generando más ROS (88).

## **6.5. El proceso reductor celular en la actividad osteoclástica**

El exceso de ROS, tiene un efecto citotóxico por lo cual debe ser regulado, esto se logra gracias a mecanismos antioxidantes, principalmente de enzimas, El factor nuclear derivado eritroide 2 (Nrf2) es un factor de transcripción de distintas enzimas citoprotectivas como la NADPH Quinona oxidoreductasa (NQO1), Heme oxigenasa 1 (HO1), cadena pesada y liviana de ferritina (FTH) y (FTL) respectivamente, Glutation peroxidasa (GPX), Thioredoxina (TNX), Gamma glutamil cistein sintetasa (GCS) y Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) (89).

En condiciones basales Nrf2 se encuentra secuestrado por la proteína asociada a ECH similar a Kelch 1 (Keap1) en el citoplasma que conduce a su degradación en el proteasoma. Durante la osteoclastogénesis la cantidad de Nrf2 se ve disminuida probablemente con el objetivo de inhibir las enzimas antioxidantes de manera que los niveles de ROS se pueden mantener, parece ser que la interacción RANK–RANKL regula positivamente la transcripción de Keap1, que previene la translocación de Nrf2 en el núcleo evitando su función como factor de transcripción (83).

Por un lado, la súper oxido dismutasa (SOD) que se encuentra en estados basales de la célula transforma el  $O_2^-$  dentro y fuera de la mitocondria para generar  $H_2O_2$ , una molécula más estable y menos reactiva, gracias a este incremento, Nrf2 pierde afinidad con Keap1 traslocandose así al núcleo para comenzar la transcripción de enzimas como la Glutación peroxidasa (GPX), que es una catalasa que transforma el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  (83,90).

GPX cataliza la reacción de oxidación de dos moléculas de glutatión utilizando el  $H_2O_2$ , para generar glutatión disulfuro (GSSG) y dos moléculas de agua, posteriormente el glutatión disulfuro se reduce nuevamente en glutatión por la glutatión reductasa (GR) que utiliza NADPH como donante de electrones, por otra parte el glutatión solo puede donar protones a los lípidos de la membrana celular y mitocondrial para evitar la peroxidación de lípidos, de manera tal que se neutralizan los hidroperóxidos formados dentro de la célula (90-92). El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido que se constituye por cisteína, glutamato y glicina, la cisteína tiene un grupo tiol y es por esta razón que sirve como donante de electrones confiriéndole acción como antioxidante por sí solo, así mismo el glutatión como sustrato de la

GPX, y de otras enzimas como la transferasa de glutatión (GST) y la glutaredoxina (Grx) (92).

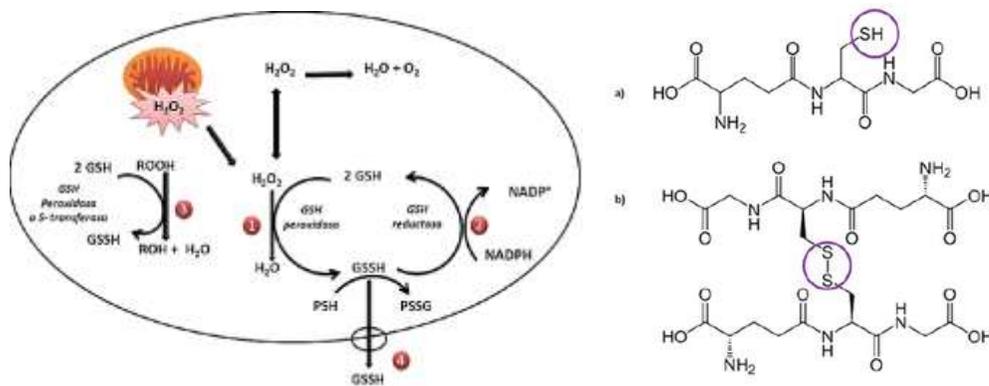
La relación GSH/GSSG es muy importante y se ha utilizado como un indicador del estado redox de la célula y los cambios de la relación pueden modificar la expresión genética de genes dependientes del estado redox, GSH es sintetizado en el citoplasma y su contenido es de alrededor de 10-14 mM y fácilmente el 30% penetra a los organelos por porinas y a través de canales en contra del gradiente de concentración, dirigiéndose hacia el núcleo y la mitocondria principalmente (93). Durante la osteoclastogénesis, se ha observado un decrecimiento de la relación GSH/GSSG que está determinado por el estímulo de RANKL, este promueve la disminución en la expresión de la GSC, de manera muy interesante la disminución de los niveles generales de GSH inhiben la osteoclastogénesis bloqueando el importe nuclear de NF $\kappa$ B y de AP1 (6), este efecto se ha visto atribuido a que la relación GSH/GSSG es un switch que cambia el estado proliferativo de la célula e induce la salida del ciclo celular para iniciar el proceso de diferenciación, y posteriormente a un estado de muerte programada si el estado oxidado continua progresivamente, este switch es posible porque el aumento en GSSG en el citosol, genera una acumulación – translocación de GSH en el núcleo, lo que facilita la expresión genética y la capacidad de distintas proteínas para unirse a sus objetivos en el núcleo, se sabe que NF $\kappa$ B posee un residuo de cisteína en su región de unión con el DNA que debe encontrarse reducido, comportamientos similares se han visto en otros factores como c-fos y c-jun, importantes en la osteoclastogénesis (94).

Nrf2 regula positivamente la expresión de GSC, que es la primera enzima en una vía biosintética que utiliza grupos cisteína para la síntesis del glutatión, la cisteína es obtenida mediante un proceso enzimático que transforma la metionina en homocisteína y luego en cisteína (94). Últimos enfoques han logrado sintetizar un fármaco llamado N Acetil Cisteína, NAC, es un derivativo del aminoácido L-Cisteína, por lo cual es un precursor en la síntesis del glutatión, sin embargo, contiene un grupo tiol que le confiere capacidad antioxidante per se (95), en cultivo ha mostrado la alteración negativa de vías de señalización activadas por el factor de necrosis tumoral (TNF) y la consecuente inhibición de la activación de NF $\kappa$ B, también ha mostrado inhibir MAPK como ERK y P38, que como se mencionó anteriormente se activan en presencia de ROS, confiriéndole a NAC un rol antioxidante (95), la vida media de NAC en cultivo es de aproximadamente 2 horas (96), con respecto a los osteoclastos, en

los antecedentes del laboratorio NAC ha mostrado disminuir la resorción (1-3) pero es un efecto que también se ha evaluado en otros estudios *in vitro* e *in vivo* (97,98).

Por otro lado las HO son enzimas encargadas del catabolismo del grupo Heme, en osteoclastos la HO1 que es la forma inducible, puede ser expresada por efectos del estrés oxidativo, citoquinas, exceso de iones de metales pesados, y el grupo heme por si solo; la HO1 degrada el grupo heme a hierro libre, monóxido de carbono y biliverdina, que es subsecuentemente convertida a bilirrubina por la biliverdina reductasa, la bilirrubina funciona como un agente reductor, porque cuando es oxidada se convierte en biliverdina que nuevamente es reducida a bilirrubina (100).

**Fig. 4 Función antioxidante de GSH.**



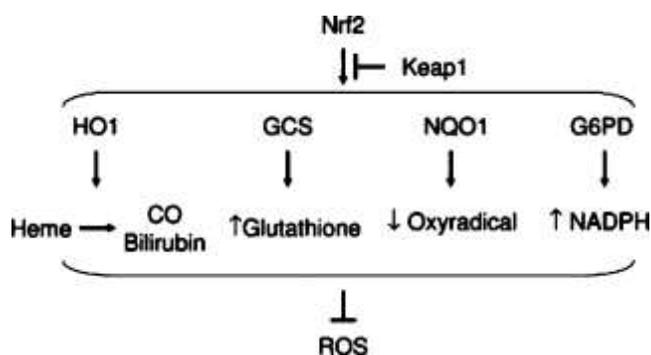
**Fuente:** S. Dieguez. Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel, Acta Bioquím Clín Latinoam (99).

Se ha encontrado que la sobre expresión de la HO1 inhibe la osteoclastogénesis *in vitro* e *in vivo*, y que este efecto es mediado por la regulación negativa de la expresión de TRAF6, c-fos, concordando con un efecto antioxidante (100), así mismo se ha observado una regulación negativa de la expresión de la HO1 por la interacción RANK-RANKL, lo que genera un ambiente oxidativo en la célula y permite la liberación de distintas citoquinas (84).

NQO1 es una reductasa con capacidad de unión a flavin adenin nucleótido (FAD) el cual es un cofactor tipo redox porque actúa como un aceptor de electrones mientras se va oxidando; NQO1 forma un homodímero que reduce quinonas a hidroquinonas, lo que previene la reducción de quinonas que resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno, esto

lo hace a través de la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>, la generación de una relación alta de NAD<sup>+</sup>/NADH se ha asociado con el metabolismo celular, y en osteoclastos la sobreactividad de NQO1 ha mostrado la disminución de la osteoclastogénesis por el aumento en AMPK que se ha identificado como supresor (101-103); G6PD es una enzima que cataliza la primera reacción de la vía de la pentosa fosfato con el fin de generar NADPH a partir de la reducción de la NADP<sup>+</sup> por la deshidrogenación de la propia enzima, cuando aumenta la relación NAD<sup>+</sup>/NADH la síntesis de NADPH debe aumentar por lo cual Nrf2 también genera su expresión en un ambiente oxidativo, se ha observado una regulación negativa de la expresión de G6PD en osteoclastos durante su diferenciación (104).

**Fig. 5 Las enzimas citoprotectoras mediadas por Nrf2 disminuyen ROS.**



**Fuente:** Hiroyuki K. Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes Redox Biology (103).

Nrf2 regula transcripcionalmente la expresión de HO1, GCS, NQO1 y G6PD. HO1 convierte el hemo en óxido de carbono (CO) y bilirrubina, y ellos eliminan ROS. GCS aumenta el glutatión intracelular, lo que resulta en la eliminación de ROS. NQO1 reduce oxidoradicales - quinonas. G6PD aumenta el NADPH intracelular, lo que aumenta la eliminación de ROS.

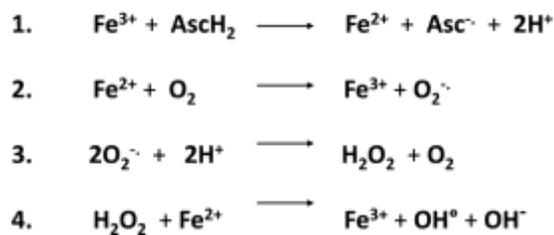
Por otra parte, hay moléculas cuya estructura les confiere capacidad antioxidante y que la célula también utiliza con el fin de controlar las especies reactivas de oxígeno. La vitamina E se encuentra en el interior hidrofóbico de la membrana celular y funciona como un antioxidante para evitar la peroxidación lipídica, la vitamina E dona los electrones de su grupo hidroxilo a otros ROS, esta reacción genera radicales alfa tocoperoxil oxidados que son reducidos nuevamente en vitamina E por la GPX o por la vitamina C - ácido ascórbico (A.A) y comenzar el ciclo nuevamente (105). En osteoclastos la utilización de vitamina E ha mostrado efectos contrarios, en algunos casos ha mostrado reprimir la osteoclastogénesis a

través de la disminución de ROS (104-107) mientras que otros estudios han evidenciado que incrementa la fusión y la resorción *in vitro* e *in vivo*, que parece ser un efecto independiente a su acción antioxidante y que está ligada a la sobre expresión de DC-STAMP, sin embargo, estos efectos pueden deberse a la distinta reactividad de las células y las concentraciones utilizadas (108).

Con respecto al ácido ascórbico se sabe que tiene capacidad antioxidante por si solo por sus dos grupos hidroxilo, se sabe que en osteoclastos el transporte del ácido ascórbico es exclusivo por canales GLUT 1 dada su similitud estructural a la fructosa, por lo que, para ingresar a la célula debe estar en su forma oxidada como ácido dehidroascorbato, una vez dentro de la célula es rápidamente reducido a su forma como ácido ascórbico por reductasas dependientes de NADH. En concentraciones fisiológicas se estima las concentraciones de ácido ascórbico entre 27 y 51µm (4 a 9 µg/ml), concentraciones que se han visto relacionadas con un estímulo osteoclastogénico temprano al generar pequeñas cantidades de ROS por una reacción fenton específica (109,110). No obstante, en concentraciones más elevadas su acción antioxidante genera un efecto anti osteoclastogénico, adicionalmente otro de sus efectos en la disminución de la osteoclastogénesis se debe a una inhibición de la expresión de la CAII, aunque no se conoce si este efecto es independiente a su rol como antioxidante (111-112), la vida media del ácido ascórbico en cultivo es de 2 horas (113).

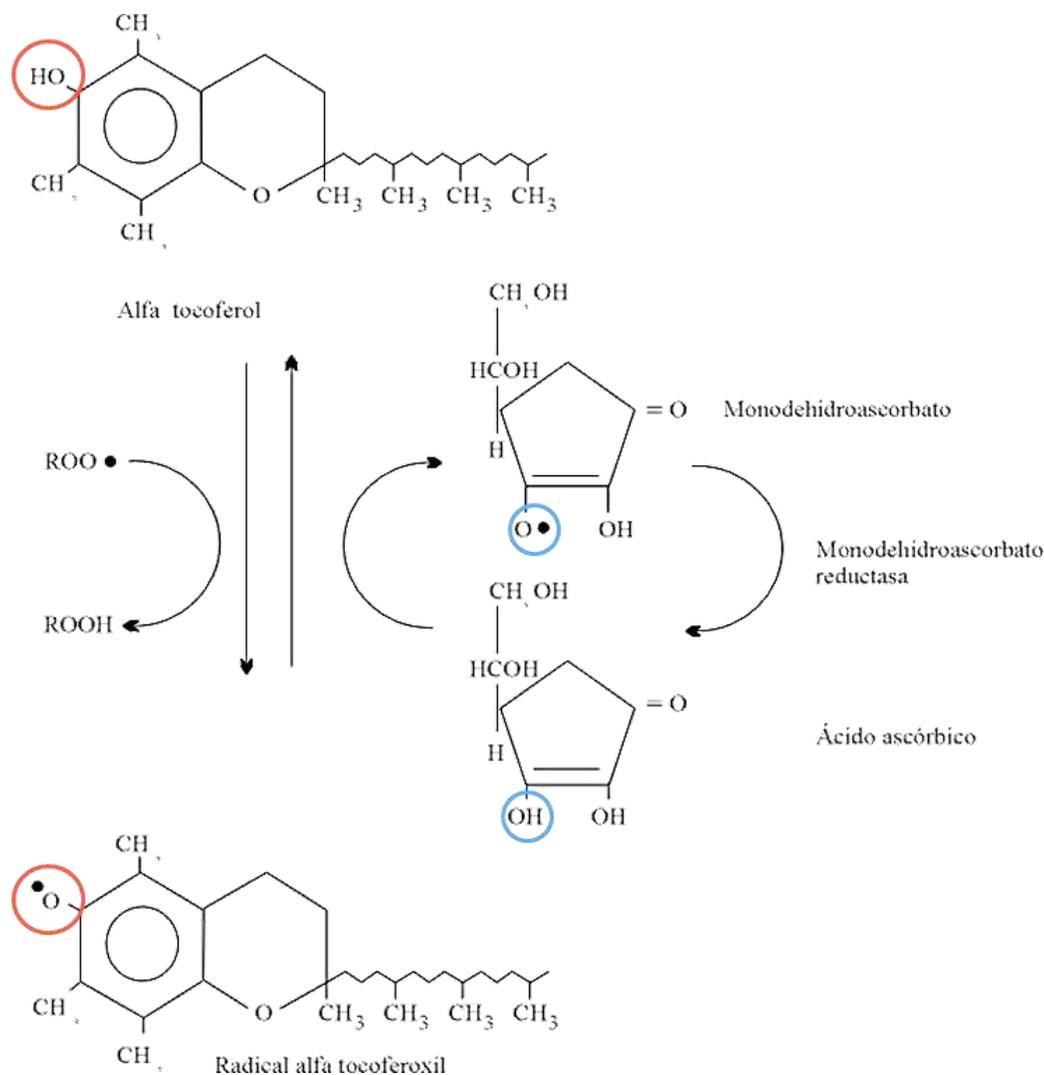
**Fig. 6 Reacción Fenton mediada por la vitamina C.**

**VITAMIN C AND FENTON REACTION**



**Fuente:** Mastrangelo D. Vitamin C against Cancer. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. 2017. Libro (114).

(1) La vitamina C (ácido ascórbico, AscH<sub>2</sub>) reduce los iones férricos (Fe<sup>3+</sup>) a los iones ferrosos (Fe<sup>2+</sup>)  
 (2) El ion ferroso reacciona con el oxígeno para producir superóxido. (3) La dismutación de superóxido conduce al peróxido de hidrógeno. (4) El peróxido de hidrógeno reacciona con iones ferrosos para formar radicales hidroxilo. Leyenda: Asc: ácido ascórbico, vitamina C, Fe = hierro, O = oxígeno, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrógeno, OH<sup>•</sup> = radical hidroxilo (114).

**Fig. 7 Mecanismos antioxidantes del alfa tocoferol y el ácido ascórbico.**

**Fuente:** Rodríguez G, Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. Rev Cubana Aliment Nutr (115).

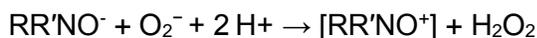
La vitamina E corresponde al nombre dado a varias moléculas con estructuras similares, en el cuerpo humano el alfa tocoferol es el más abundante y el más activo, su grupo hidroxilo en el anillo cromano facilita la donación de átomos de hidrógeno para reducir agentes oxidantes al donar su electrón, esto lo convierte a su vez en un radical libre (círculos rojos) que es reducido, de manera no enzimática, por el ácido ascórbico, este a su vez tiene dos grupos hidroxilo que pueden donar átomos de hidrogeno, reduciendo al alfa tocoferol y a otras sustancias oxidantes (círculos azules), el ácido ascórbico es reducido nuevamente por la monodehidroascorbato reductasa (115).

## 6.6. Agentes reductores utilizados en el estudio de la actividad osteoclastogénica

A partir de lo anterior se ha establecido ROS como un posible objetivo terapéutico para enfermedades que significan un aumento en la resorción ósea, como la osteoporosis, artritis, periodontitis e incluso en movimientos ortodónticos y cirugías maxilofaciales. Varios estudios han probado diferentes compuestos que afectan el proceso de diferenciación inducido por ROS, a pesar de que algunos afectan las vías de señalización activadas no todos los efectos se deben a propiedades reductoras del compuesto químico utilizado (5-14); sin embargo, han mostrado mejorar la densidad ósea en modelos animales y humanos, por lo cual es importante tener en cuenta los potenciales beneficios de terapias con propiedades antioxidantes.

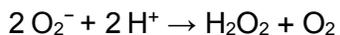
Estudios previos han demostrado que el control de mecanismos enzimáticos antioxidantes, como la expresión de SOD y catalasas, es clave para mantener el equilibrio REDOX del osteoclasto (116). A partir de la evidencia de que la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes ha mostrado proteger a distintas células del daño oxidativo, se han generado varios miméticos (116,117), que buscan igualar la actividad de las enzimas de manera química; aunque varios de ellos han sido estudiados en distintas células, actualmente pocos de ellos han sido estudiados en osteoclastos y sus roles en éstas células aun no son bien conocidos, como en el caso del 1-λ1-oxidanil-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ol (TEMPOL) (118) un mimético de la SOD, se escogió para este trabajo dada la importancia de la SOD en la regulación de ROS mitocondrial en Osteoclastos.

**TEMPOL** es un radical estable tipo nitróxido cíclico, tiene habilidad para interactuar con radicales libres, el mecanismo similar a SOD ocurre de la siguiente manera:



La oxidación de un electrón del radical nitróxido ( $RR'NO^{\cdot}$ ) por la forma protonada de superóxido ( $HO_2^{\cdot-}$ ) depende del pH y convierte el nitróxido en el correspondiente catión de oxoamonio ( $RR'NO^+$ ). El catión de oxoamonio se puede reducir con  $O_2^{\cdot-}$  de vuelta al radical nitróxido, quedando así:  $[RR'NO^+] + O_2^{\cdot-} \rightarrow RR'NO^{\cdot} + O_2$

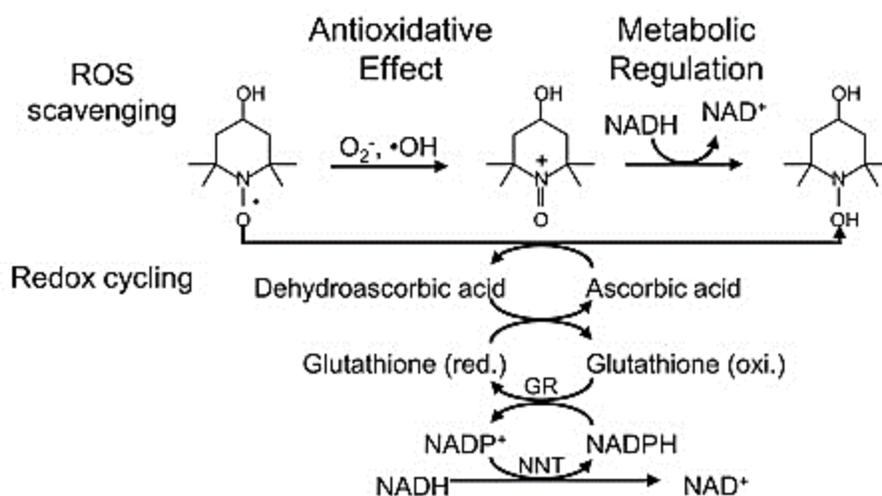
Al combinar ambas ecuaciones se puede dilucidar mejor la reacción:



Por lo cual su acción principal es tomar 2  $\text{O}_2^-$  en presencia de H para transformarlos en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ , del mismo modo que lo hace SOD, sin embargo, a pH fisiológico la reacción tarda 2 o 3 veces más que la SOD, mientras que en ambientes ácidos puede lograr una tasa de reacción similar.

TEMPOL también tiene actividad en inhibir la reacción fenton, aceptando el electrón del metal reducido así  $\text{RR}'\text{NO}^- + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{RR}'\text{NOH} + \text{Fe}^{3+}$  (119), por otra parte TEMPOL puede sufrir una segunda reducción, mediada por una regulación metabólica o por el A.A, el A.A convertido en ácido dehidroascorbico puede incrementar la concentración de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , que como se mencionó anteriormente facilita la expresión de enzimas antioxidantes(120) la vida media del TEMPOL en medio de cultivo es de 12 minutos (121), sin embargo la forma catiónica del TEMPOL reacciona directamente con el  $\text{O}_2^-$  para producir  $\text{O}_2$  y regenerar al TEMPOL, por lo cual las concentraciones de TEMPOL permanecen constantes (122).

**Fig. 8 TEMPOL aumenta la relación  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$**



**Fuente:** Yamato M. TEMPOL increases  $\text{NAD}^+$  and improves redox imbalance in obese mice. Redox Biology (120).

TEMPOL genera  $\text{NAD}^+$  por dos vías, la primera por su acción como SOD y segundo, por el sistema de ciclos redox *in vitro* GR: glutatión reductasa; NNT: nicotinamida nucleótido transhidrogenasa.

Teniendo en cuenta que el rol de la SOD es solo el primer paso para la neutralización de las especies reactivas de oxígeno ya que el  $H_2O_2$  también es reactivo se requiere el estudio de la acción de las GPX por lo cual se estimula su actividad al agregar su sustrato directo el **Glutati6n** (6) que en cultivo tiene una vida media de menos de una hora (123) o de manera indirecta a trav6s de la N- Acetil cisteína (**NAC**) que sirve como donante de cisteína para la síntesis de glutati6n o como carrier, NAC en medio de cultivo tiene una vida media de 5 horas (124). Sin olvidar por supuesto que por sí solos tienen capacidad antioxidante. Ambos han mostrado reducci6n de la osteoclastogénesis y actividad resorptiva debida principalmente a la inhibici6n de la fusi6n *in vivo* e *in vitro* (97,98).

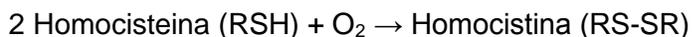
Por otra parte debido a que la vitamina E es liposoluble y no atraviesa las membranas, el Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (**TROLOX**) un Mimético de la vitamina E, presenta una estructura química similar con respecto a su anillo cromano, responsable del efecto antioxidante, pero carece de la cadena lateral, por lo cual es hidrosoluble y puede atravesar libremente las membranas celulares, ha sido brevemente estudiado en el metabolismo óseo, para células en cultivo su aplicaci6n resulto en una disminuci6n de la secreci6n de RANKL en osteoblastos, en osteoclastos mostr6 una disminuci6n de la osteoclastogénesis cuando fue aplicado en etapas tempranas de diferenciaci6n, por lo que parece afectar las etapas de fusi6n, por lo que para este estudio se decidi6 analizarlo en cultivo individual (61), aunque no se ha reportado su vida media, el TROLOX ha mostrado reducci6n de agentes oxidantes entre los 15 y los 20 minutos despu6s de su aplicaci6n en cultivo (125).

## 6.7. Agentes oxidantes utilizados en el estudio de la actividad osteoclastogénica

Para confirmar que la formaci6n de ROS es esencial para la diferenciaci6n se han realizado estudios varios donde se induce un ambiente oxidativo usando  $H_2O_2$ , ya que en la osteoporosis se ha observado elevadas concentraciones de este en plasma y se ha asociado con la patogénesis de la enfermedad (126), varias concentraciones de  $H_2O_2$  han sido utilizadas *in vitro* confirmando su papel en la osteoclastogénesis por el aumento de ROS activando las vías anteriormente mencionadas (9).

Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fisiológicos varían desde 0,001 μM a máximo 0.7 μM, cuando este es aplicado en el medio de cultivo las concentraciones intracelulares son aproximadamente 10 veces menores que las concentraciones extracelulares, y desaparece en el medio en aproximadamente 1 hora, en células tiroideas una concentración de 50μM disminuye en un 80% al cabo de 2 horas (127), sin embargo, esto no se encuentra reportado en osteoclastos.

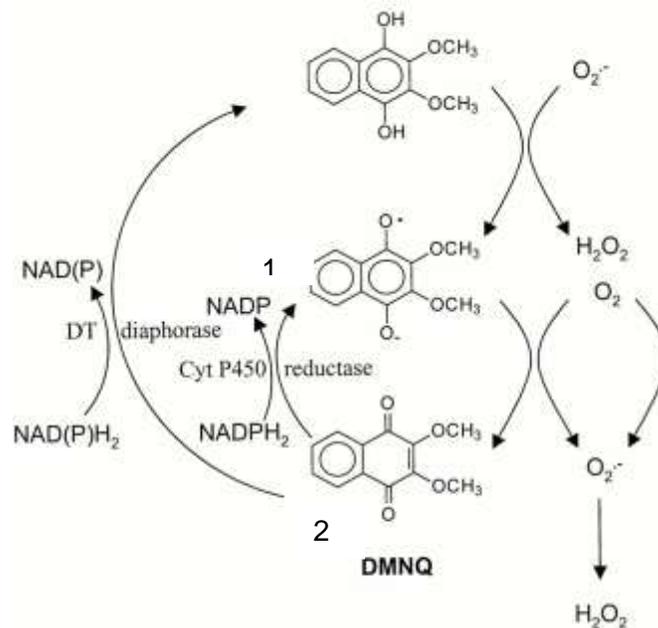
Se ha observado que en pacientes con homocisteinemia, es decir un incremento de homocisteína en el plasma sanguíneo, esta representa un factor de riesgo para el desarrollo de la osteoporosis al afectar el metabolismo óseo (128); durante la generación de la cisteína para la síntesis del glutatión uno de los productos intermedios de este proceso es la homocisteína (129), esta tiene la capacidad de transformarse nuevamente en metionina para continuar un ciclo, no obstante en exceso funciona como una molécula de señalización que cuando se encuentra en el medio extracelular se une a los receptores activados de Proteínasa asociados a proteína G (PAR2) presentes en los precursores osteoclásticos, esta interacción genera una cascada de señalización que genera un aumento en la transcripción de las NADPH oxidasas y de esta manera aumentando ROS (130-132), La homocisteína se puede auto-oxidar en sus grupos tiol en presencia de metales de transición como Cu<sup>2+</sup> y también O<sub>2</sub> a pH fisiológico, dando lugar a la homocistina, en presencia de O<sub>2</sub><sup>-</sup> puede generar peróxido de hidrógeno de la siguiente forma:



Por otro lado, la homocisteína ha mostrado incrementar la actividad de la SOD, a la vez que disminuye la actividad y expresión de la GPX, por lo cual se incrementan las concentraciones intracelulares del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (131). Las concentraciones intracelulares normales de homocisteína varían entre 0,05 y 0,011 μmol/L (132), a pesar de que no se reporta su tiempo de vida media en cultivo, se sabe que en plasma la vida media es de aproximadamente 3.7 horas (133). Estudios siguientes mostraron que las concentraciones altas de homocisteína estimulan la actividad osteoclástica *in vitro* al aumentar las concentraciones de ROS intracelular y estimular la actividad de MAPK como la p38, que es osteoclastogénica, pero también activó la expresión de integrina β3, por lo que es probable que tenga también un rol en actividad resorptiva como tal; en osteoclastos ha demostrado ejercer efecto en la producción de ROS a los 10 minutos (134).

La 2,3-Dimethoxi-1,4-naftoquinona (**DMNQ**) es una quinona que es capaz de atravesar la membrana celular, es conocida por la capacidad de generar superóxido, y se utiliza ampliamente en investigación para estudiar el rol de ROS en toxicidad celular, apoptosis y necrosis de diferentes tipos celulares, actualmente su aplicación se centra en estudios sobre cáncer, donde en uno de ellos ha mostrado inducir apoptosis por activación de caspasas en células U937 en leucemia mieloide, gracias a la formación de ROS e inducción de estrés oxidativo, sin embargo este compuesto no ha sido estudiado en osteoclastos y en este estudio va a ser utilizado por primera vez (135,136).

**Fig. 9 Estructura y mecanismo de acción de DMNQ**



**Fuente:** Adaptado de Liu R. Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. Am J Physiol. 1998 (137).

DMNQ es reducido a radical hidroquinona o semiquinona por oxidoreductasas celulares en presencia de O<sub>2</sub>. El radical semiquinona [1] entra en una rápida autooxidación con la regeneración del DMNQ [2] y la formación concomitante de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La hidroquinona [2] reacciona rápidamente con O<sub>2</sub><sup>-</sup> para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y semiquinona [1], volviendo a completar el ciclo, el O<sub>2</sub><sup>-</sup> liberado anteriormente dismuta para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y NADPH como donador de electrones para reconstituir a DMNQ. DMNQ no puede formar conjugados por los grupos metoxi en sus carbonos C-2 y C-3. DT: NADPH deshidrogenasa, Cyt: Citocromo – transferencia de electrones (137).

Se sabe que la aplicación de DMNQ (10 $\mu$ M), en células de pulmón, provoca una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocho veces mayor después de 1 hora de su aplicación, y que el DMNQ mantiene estables las concentraciones de ROS a lo largo de un cultivo ya que se regenera por el ciclo redox mencionado en la figura 9, por lo cual su uso se ha determinado como un modelo que permite comparar los resultados con las patologías crónicas que generan estrés oxidativo (137).

Actualmente no se conocen otros compuestos inductores de ROS utilizados en osteoclastos. A lo largo de varias investigaciones se ha observado que los osteoclastos son muy sensibles a ROS generando distintas respuestas dependiendo de los niveles intracelulares, bajos niveles de ROS estimulan la resorción ósea generando diferenciación osteoclástica puede potenciar la acción de RANKL para inducir no solo la diferenciación del pre osteoclasto, sino también de osteoclastos vecinos a través de la liberación de HMGB1 que, como señal paracrina, termina en una activación de TRAF6 (10), sin embargo al traspasar cierto límite, la exposición crónica de los osteoclastos a su nivel alto de estrés oxidativo genera efectos citotóxicos por el daño a DNA, proteínas y lípidos dando lugar apoptosis celular vía activación de caspasas (87,138). A pesar de lo anterior es aún incierto hasta qué punto los niveles de ROS que potencian la diferenciación de los osteoclastos se mantienen estables y en qué momento se regula por mecanismos antioxidantes, y de igual manera si ROS, a parte de su rol en la diferenciación, es necesario para la actividad resorptiva.

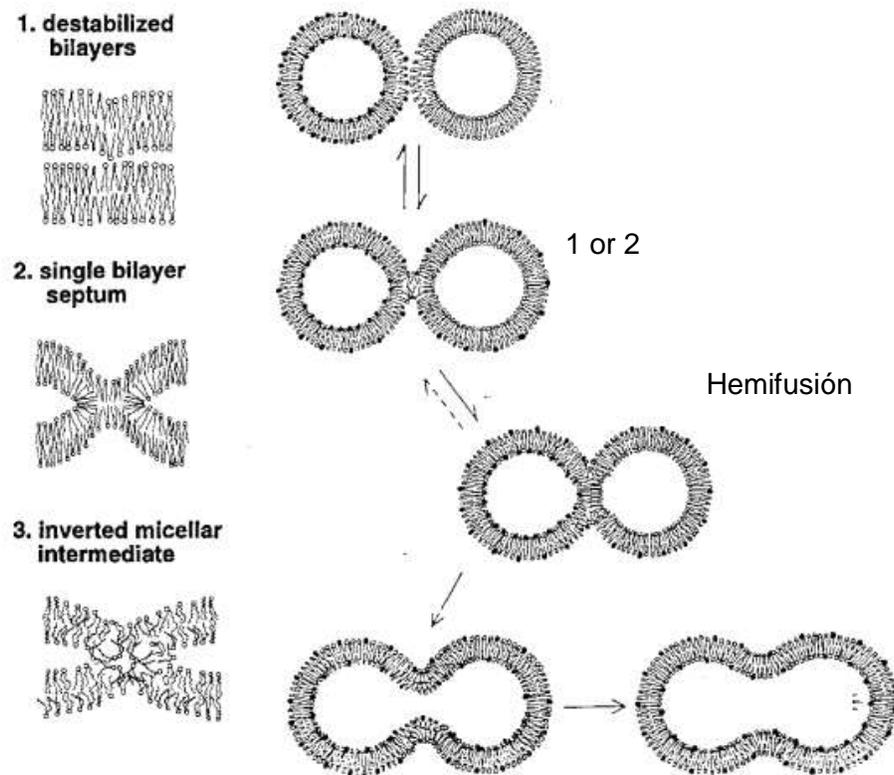
## **6.8 Obtención de células similares a osteoclastos por fusión con PEG**

La fusión de las membranas es un evento fisiológico visto en muchos procesos, como endocitosis, exocitosis, transporte, división celular y por supuesto, fusión celular, en estos eventos muchas proteínas promueven el acercamiento cercano entre las membranas de células que se van a fusionar y otras forman poros que permite la comunicación entre los espacios citosólicos de ambas células.

PEG es un polímero hidrofílico que causa la deshidratación de la superficie de las membranas, PEG posee una estructura que maximiza los puentes de hidrogeno, por lo cual se le asocia una propiedad absorbente, por lo cual eleva la presión osmótica, permitiendo la agregación entre las moléculas de PEG y el agua, acercando las membranas entre sí. PEG

es ampliamente utilizado para mediar la producción de hibridomas (139). La cercanía entre las membranas disminuye la energía necesaria para realizar la fusión, sin embargo esto no es un evento determinante en la fusión, PEG desestabiliza los lípidos de las membranas, que genera la localización de fosfolípidos cargados negativamente como la fosfatidilserina en la parte externa de la membrana, esta redistribución de la fosfatidilserina desde su localización normal en la parte interna de la membrana (citoplasmática) hacia la parte externa se conoce como flip de fosfatidilserina (140,141) , esto significa un rearrreglo de las bicapas lipídicas que se conoce como hemifusión, posteriormente y a medida que el defecto avanza, los componentes de la bicapa lipídica se mezclan así como los contenidos internos de las membranas, esto permite un constante flujo de iones cargados positivamente, especialmente  $Ca^{2+}$  disminuyendo la repulsión electrostática porque se unen a los lípidos cargados negativamente y deja de interactuar con el agua, lo que genera una repulsión adicional del agua aproximando aún más las membranas entre sí, finalmente se fusionan también causando un sobrelapamiento de las membranas y la apertura de un poro por el cual el contenido celular se puede mezclar alcanzando la fusión. No obstante, los mecanismos y la secuencia de eventos que generan la fusión son todavía un debate (139-143).

Se sabe que la exposición de las células a periodos cortos en presencia de PEG, genera la deshidratación suficiente para la interacción íntima entre las membranas, pero su presencia crónica genera una presión osmótica demasiado elevada que provoca muerte celular, porque genera una disrupción en las membranas que termina por romperlas (139-143).

**Fig. 10. Mecanismo de fusión con PEG**

**Fuente:** Adaptado de Lentz B. Poly (ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol Membr Biol* (139).

Modelo de fusión de tres estados, 1) La cercanía entre las membranas en conjunto con una corriente de iones desestabiliza las membranas, 2) Se forma un septo conformado por una sola bicapa lipídica o 3) se genera la formación de un intermedio micelar invertido, donde los lípidos de la membrana se desorganizan y permiten el paso más fluido de iones, en este momento ocurre la hemifusión, que es aún reversible; posterior a esto un nuevo reareglo genera un poro por el que inicia la fusión directamente (139).

## **7. Métodos**

Este trabajo correspondió a un proyecto de investigación experimental.

### **7.1 Elaboración de láminas de hueso**

Las láminas de hueso se elaboraron a partir de hueso cortical de escápula de bovino, los huesos se cortaron transversalmente con una segueta, y se lijaron manualmente para obtener láminas de hueso con superficies homogéneas de un área aproximada de 7 mm<sup>2</sup> y un grosor de 0.5 mm. Con el fin de esterilizarlas, se lavaron con una solución de SDS al 10% por 8 horas bajo agitación continua, aclarando con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, posteriormente se aplicó etanol al 70% por 60 minutos, se lavaron dos veces con medio DMEM y finalmente se dejaron bajo luz U.V por 1 hora (1-3).

### **7.2 Cultivo celular**

La línea celular de monocitos humana U937 con capacidad de diferenciación hacia células similares a osteoclastos, fue mantenida bajo una atmosfera humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C en DMEM (Invitrogen - Carlsbad, CA, USA) suplementado con SFB al 10% (Invitrogen/Gibco - Carlsbad).

### **7.3 Fusión con PEG**

Las células U937 cultivadas previamente se contaron para lograr un total de 50.000 células por pozo aproximadamente, se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el tubo se puso sobre gasa estéril para eliminar los residuos de DMEM y evitar diluir el PEG, al pellet se aplicó 0.5 µl de PEG mw:1450 por cada 50.000 células, se agitó suavemente para resuspender las células y se dejó actuar por un periodo de 5 minutos, se procedió a realizar una dilución seriada con DMEM con SFB al 10% aplicando 0.4 µl, 0.8 µl y 0.16 µl, por cada 50.000 células, cada 60 segundos por 5 minutos cada uno. Posteriormente las células se centrifugaron y se lavaron 2 veces con DMEM para retirar el PEG, se resuspenden en 20µl de DMEM con SFB al 10% por pozo (1-3).

## 7.4 Tratamiento con Agentes Reductores y Oxidantes

Se colocó una lámina de hueso estéril por pozo en cajas de 48 pocillos, se sembraron 20  $\mu$ l células/hueso (50.000 células) resuspendidas en DMEM con SFB al 10%, tratadas o no con PEG, fueron mantenidas bajo una atmosfera humidificada a al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 2 horas para permitir su adherencia a la lámina de hueso. Posteriormente los pozos fueron llevados a un volumen final de 300  $\mu$ l de DMEM con SFB al 10%.

Aplicándolos directamente en el medio DMEM, se realizó inducción oxidativa, DMNQ 0.15  $\mu$ M, Homocisteína 100  $\mu$ M, Peróxido de hidrógeno 50  $\mu$ M o tratamiento con agentes reductores TROLOX 500  $\mu$ M, TEMPOL 100  $\mu$ M, Ácido Ascórbico 50  $\mu$ g/ml, NAC 30 mM, Glutatión 32 mM +BME 25  $\mu$ M 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 1.

El tratamiento con agentes reductores y oxidantes se realizó en 3 etapas:

1. Aplicación pasadas dos horas de adherencia de las células al hueso posterior a la fusión con PEG.
2. Aplicación 2 horas antes de realizar el protocolo de fusión con PEG, con el fin de determinar su efecto sobre el precursor osteoclástico.
3. Aplicación en los días 1, 2 y 3 posteriores a la realización del protocolo de fusión con PEG, para determinar su efecto en la resorción una vez las células se encontraron fusionadas.

### 7.4.1 TABLA.1 Caracterización de concentraciones de agentes oxidantes y reductores en osteoclastos.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentraciones reportadas en la literatura.</b>	<b>Tipo de células reportadas en la literatura.</b>	<b>Concentración definida para este estudio.</b>
DMNQ (129,130) Quinona generadora de superóxidos Sc-202586 Santa Cruz Biotechnology	0, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{M}$ . Final*: 4 $\mu\text{M}$ (129) 0.05, 0.1, 0.2, 1, 5 $\mu\text{M}$ Final*: 0.208 $\mu\text{M}$ (130)	U937 (129)  PBMC de hombres y mujeres adultos (130)	0.15 $\mu\text{M}^*$
Homocisteína (128) Sc-214939 Santa Cruz Biotechnology	0, 10, 50, y 100 $\mu\text{M}$ Final: 100 $\mu\text{M}$ (128)	PBMC de hombres adultos (128)	100 $\mu\text{M}$
Peróxido de Hidrogeno (9) 4% JGB	20,50,100 $\mu\text{M}$ Final*: 50 $\mu\text{M}$ (9)	BMMS de ratón (9)	50 $\mu\text{M}$
TROLOX Mimético de la vitamina E (111) Sc-200810 Santa Cruz Biotechnology	100,200,500 $\mu\text{M}$ Final*: 500 $\mu\text{M}$ (111)	BMMS de ratón (111)	500 $\mu\text{M}$
TEMPOL Mimético de la SOD (138) Sc-200825 Santa Cruz Biotechnology	100 $\mu\text{M}$ (138)	PBMC de hombres y mujeres adultos (138)	100 $\mu\text{M}$

Ácido ascórbico (26,139) 1043003 Sigma Aldrich	0, 10, 50 y 100 µg/ml Final*: 50 µg/ml (26) 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1,5,50 µg/ml Final*: 50 µg/ml (139)	RAW 264.7 (26)  BMMS de ratón (139)	50 µg/ml
NAC (64) Precursor de L-cisteína fuente de cisteínas A7250 Sigma Aldrich	1, 3, 10 y 20 mM Final*: 20 mM (64)	RAW 264.7 (64)	30 mM**
Glutación (5) G4251 Sigma Aldrich	4 mM (5)	RAW264.7 (5) BMMS de ratón6	32 mM + BME 25 µM***

Nota: En la columna de concentraciones reportadas en la literatura, el valor designado como Final\* corresponde a la concentración que se utilizó para dicho estudio después de hacer las correspondientes curvas de eficacia del efecto contra concentración del reactivo.

\* Se realizó una curva de viabilidad previa, realizando el seguimiento de los reactivos durante 4 días, DMNQ disminuyó la viabilidad significativamente desde el segundo día con un porcentaje de células vivas inferior al 50%, por lo cual se decidió utilizar una concentración más baja que no alteró significativamente la viabilidad.

\*\* En los antecedentes del laboratorio se testaron diferentes concentraciones de NAC en células fusionadas con PEG y su eficiencia en la alteración de la resorción 30 mM fue el que generó la disminución más significativa, por lo cual para este estudio se decidió continuar usando esta concentración (1-3).

\*\*\* Para el Glutación se utilizó la concentración de 4 mM reportada en la literatura, sin embargo, no presentó alteraciones significativas en la producción de especies reactivas de oxígeno y en la resorción ósea. Por lo tanto, se planteó el uso de un segundo agente reductor, el beta mercapto etanol (BME), a una concentración de 25 µM que permite mantener reducido el glutati6n (146,147). Sin embargo, a pesar de la adici6n de BME a esta concentraci6n, el glutati6n continu6 sin efectos significativos en la disminuci6n de ROS y en la resorción, en consecuencia, se ensayaron distintas concentraciones (8, 16, 32 y 64 mM) en conjunto con 25 µM de BME, donde 32 mM presentó la mejor eficiencia en alterar la resorción, por lo cual se decidió utilizar esta concentraci6n.

## 7.5 Ensayo de viabilidad

Las células U937 fueron diferenciadas hacia osteoclastos con PEG y sembradas en cajas de 96 pocillos con 50.000 células/pozo (sin hueso), en medio DMEM con SFB al 10% a un volumen final de 100  $\mu$ l, en la presencia de los agentes oxidantes y reductores, la viabilidad fue medida durante 4 días de cultivo y se realizó una curva; para esto se tomó una muestra de 5  $\mu$ l de células de cada pozo, con punta abierta para evitar separar las células fusionadas, y mezclada con 5  $\mu$ l 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 microscopio de luz invertido (EUROMAX®), 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 expresó en términos de porcentaje según la ecuación:  $\% = (V * 100) / T$ , donde, T = número total de células (viables y no viables) contadas en la cámara.

La determinación de la viabilidad celular con el ensayo MTT se realizó de la siguiente manera: debido a que las células U937 no son adherentes y que la presencia de reactivos que modifican el estado redox puede causar errores en la reacción del MTT y un posterior error en la lectura, transcurridas las 24 horas después de la siembra, las células fueron recolectadas en diferentes tubos de microcentrifuga, se lavaron 3 veces con PBS y se re suspendieron en 100 $\mu$ l de medio DMEM; posteriormente se añadieron 10  $\mu$ l de la solución de MTT 5 mg/ml a cada pozo, se incubaron durante 4 horas a 37°C. Después de 4 horas las células se centrifugaron a 1200rpm, se retiró el medio cuidadosamente y se añadieron 200  $\mu$ l de una solución de 4 mM HCl, 0.1% Nondet P-40 (NP40) en isopropanol para diluir los cristales de MTT. Luego se midió la absorbancia a 570nm usando lector de ELISA. Lo anterior se repitió a las 72 horas. Para cuantificar la viabilidad celular, el ensayo MTT se estableció tomando como 100% el valor del control NO PEG y cuantificando la viabilidad celular como porcentaje del control. Este ensayo se realizó por duplicado en experimentos independientes.

## 7.6 Evaluación de ROS

Con el fin de determinar la presencia de ROS, las láminas de hueso donde previamente se sembraron las células U937 fusionadas con PEG y que fueron tratadas con los agentes reductores y oxidantes, se retiraron del medio y se secaron cuidadosamente con una toalla de papel para ser transferidas a otra caja de 48 pocillos, se les aplicó 16 µg/ml de Dihidroetidio (DHE) (thermo scientific) y 0,0016 mg/ml Hoechst 33342 (thermo scientific) por 30 minutos en cámara húmeda, posteriormente se fijó con paraformaldehído al 4% por 30 minutos, luego las láminas fueron lavadas suavemente 4 veces con PBS estéril. La lámina de hueso se colocó sobre una laminilla portaobjetos para ser observada en un microscopio invertido de fluorescencia (KAIKA ®), con un objetivo de 40X con filtro de fluorescencia rojo y azul. Se tomaron 10 fotos representativas, por cada lámina de hueso y los niveles de ROS fueron determinados en cada fotografía cuantificando la intensidad media de fluorescencia con el programa ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health) y expresados en términos de Fluorescencia celular total corregida CTCF (148,149).

## 7.7 Tinción TRAP

Se determinó que las células multinucleadas expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) característica de los osteoclastos.

La preparación de TRAP se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo:

Para preparar 10 ml de buffer se procedió así:

1. BUFFER VERONAL (pH 10.1):

Se pesó 0.053 g de ácido barbitúrico y se disolvió en 1ml de agua destilada, se llevó con NaOH hasta el pH de 10.1; se pesó 0.082g de acetato de sodio y se disolvió en 1 ml de agua destilada 2. Se pesó 0.028 g de Tartrato de sodio y luego en 1 ml de agua con 3. Se pesó 0.0025 g de naftol AS-MX fosfato y se disolvió en 20µL de dimeti-formamina. Del 1-3 algunos autores le dicen Buffer A; 4. Se pesó 0.016 g de pararosnilina y se disolvió en 1 ml de agua destilada (a esta agua previamente aplicar 0.62 ml de HCL puro (=2N de HCl) y se colocó en agua hirviendo por 15 min; 5. Se pesó 0.016 g de Nitrito de sodio y se disolvió en 1 ml de agua destilada.

Nota: La mezcla de 1 ml de pararosanilina con 1 ml de nitrito de sodio se denomina pararosanilina hexasotizada. Esta mezcla es la más inestable. Se agregó gota a gota la pararosanilina al nitrito de sodio y posteriormente la mezcla fue filtrada. El numeral 4 y 5 algunos autores le dicen Buffer B.

PREPARACIÓN DE LA MEZCLA TOTAL de 10 ml: se mezclaron primero los componentes del veronal (pH 10.1), luego a esta mezcla se adicionó el tartrato de sodio, por último, se adicionó el naftol (Buffer A). Luego al buffer A se adicionó el buffer B: se adicionó gota a gota la mezcla de pararosanilina hexasotizada, y se completa hasta 10 ml con agua destilada.

Cada lámina fue incubada con 300µl de esta solución a 37 ° C durante 25 minutos. El colorante no unido se lavó por 7 minutos bajo agitación con una solución de alcohol-ácido, que contenía etanol, agua destilada y ácido acético glacial en una relación 70: 29: 1 (v:v) y finalmente se hizo un solo lavado con agua destilada. Estas láminas se dejaron secar a medio ambiente sobre toallas de papel (1-3).

Posteriormente cada lámina de hueso se colocó sobre una laminilla portaobjetos, para ser observada en un microscopio de luz invertido (EUROMAX®) con objetivo 40X, se realizó un registro de 10 fotos representativas con cámara digital (Cannon S70) y posteriormente un conteo de las células fusionadas TRAP positivas multinucleadas identificadas por una coloración rojiza, expresando su cantidad en términos de porcentaje con respecto a las no multinucleadas, y discriminando entre células multinucleadas de 50 a 200 µm y más de 200 µm, mediante el programa ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health) (17,18)

## **7.8 Actividad resortiva**

Posterior a la tinción TRAP, se retiraron las células de la lámina de hueso, para esto se adicionó buffer de lisis RIPA que cubrió la totalidad del hueso durante 120 minutos. Se eliminaron los residuos celulares con un cepillo dental de cerdas suaves, se lavaron 2 veces con PBS para retirar el buffer y luego se tiñeron colocando las láminas de hueso sobre 20µl de azul de toluidina durante 4 minutos y enjuagando inmediatamente con agua destilada, y se secaron al medio ambiente sobre una toalla de papel (150).

Cada lámina de hueso se colocó sobre una laminilla portaobjetos y sobre ella una laminilla cubreobjetos, para ser observada en un microscopio de luz invertido (EUROMAX®) con un

objetivo de 40X, se realizó un registro de 10 fotos representativas con cámara digital (Cannon S70). El extendido de la resorción de cada fotografía se evaluó mediante el programa ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health) y se expresó en porcentaje total de área resorbida. Según la fórmula:  $\%=(AR/AT) *100$ , donde, AR = Área total resorbida; AT= Área total del hueso.

## **7.9 Inmunofluorescencia**

Para analizar la presencia de anillos de actina como indicadores de actividad osteoclástica, las células U937 tratadas con agentes reductores y oxidantes antes y después de la fusión con PEG, después de 4 días de cultivo, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con 0.1%TRITON X por 5 minutos, se lavaron con PBS; posteriormente se aplicó una solución de 0.1% de saponina, 0.2% de ovoalbumina por 30 minutos a 37°C, finalmente se les aplicó 1 ug/ml Falloidina y 0,0016 mg/ml Hoechst 33342 durante 30 minutos a 37°C y se lavaron 3 veces esperando 5 minutos entre lavado con PBS que contiene 0.05% de azida y 50mM de NH<sub>4</sub>Cl.

La lámina de hueso se colocó sobre una laminilla para ser observada en un microscopio invertido (KAIKA®), con un objetivo de 40X con filtro de fluorescencia verde y azul. Se tomaron 10 fotos representativas por cada lámina de hueso y se evaluó el número de osteoclastos que presentaron anillos de actina. Se realizó por triplicado en experimentos independientes.

En las células U937 tratadas con agentes reductores y oxidantes antes y después de la fusión con PEG, se determinó la expresión de marcadores osteoclastogénicos de los grupos que tuvieron mejor eficacia en la alteración de la resorción ósea y en los controles (células U937 fusionadas con PEG y sin PEG); para esto se analizaron las proteínas de diferenciación NFκB, NFATc1; de fusión ERVW-1, CD47, DC STAMP, OC STAMP, ADAM 12, CDH1, Cx 43; de Actividad resorptiva TRAP, CTSK, MMP9,V-ATPase A1, CA2, αVβ3, de diferenciación: VDAC1 y CT; y NOX como enzima productora de ROS, se realizó una inmunofluorescencia indirecta.

Se realizó el cultivo de la manera anteriormente descrita durante 24, 48, 72 y 96 h, para evaluar los distintos marcadores según la tabla 2, se fijaron con paraformaldehído al 4%, para los marcadores intracelulares se permeabilizaron con 0.1%TRITON X por 5 minutos y

se lavaron con PBS, para los marcadores de membrana no se permeabilizó, posteriormente se aplicó una solución de 0.1% de saponina, 0.2% de ovoalbúmina que contenía el anticuerpo primario señalado en la tabla 2 durante toda la noche a 4°C se lavaron cinco veces con PBS que contiene 0.05% de azida y 50mM de NH<sub>4</sub>Cl. Se incubaron a 4°C durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios policlonales conjugados con fluoresceína 5 isotiocianato (FITC, 1µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) y 0,0016mg/ml Hoechst 33342 (thermo scientific), en total oscuridad y se lavaron 5 veces con PBS. Los grupos control (células U937 fusionadas con PEG y sin PEG) se incubaron con los mismos anticuerpos. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

La lámina de hueso se colocó sobre una laminilla para ser observada en un microscopio invertido (KAIKA®), con un objetivo de 40X con filtro de fluorescencia verde y azul. Se tomaron 10 fotos representativas por cada lámina de hueso y los niveles de las proteínas fueron determinados en cada fotografía cuantificando el porcentaje de células positivas para FITC y la intensidad media de fluorescencia con el programa ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health) y expresados en términos de Fluorescencia celular total corregida CTCF (148,149).

### **7.9.1 TABLA 2 Caracterización de proteínas del osteoclasto para Inmunofluorescencia (con FITC).**

#### **Proteínas de Inicio de la Maduración:**

##### 7.9.1.1 Proteínas de diferenciación:

<b>Marcador</b>	<b>Anticuerpo</b>
NFκB	Nombre: PA1-14295 Origen: Conejo Tipo: IgG Concentración: 1:200 Marca: Thermo scientific
NFATc1	Nombre: sc-7294 Origen: Ratón Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz

## 7.9.1.2 Proteínas de Fusión:

<b>Marcador</b>	<b>Anticuerpo</b>	<b>Marcador</b>	<b>Anticuerpo</b>
ERVW-1	Nombre: sc-30640 Origen: Cabra Tipo: igG Concentración: 50 a 1:500 Marca: Santa cruz	ADAM 12	Nombre: sc - 16527 Origen: Cabra Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa cruz
CD 47	Nombre: sc-12730 Origen: Raton Tipo: IgG Concentración: 1:100 a 1:400 Marca: Santa Cruz	CDH1	Nombre: sc - 9426 Origen: Raton Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa cruz
DC STAMP	Nombre: sc-98769 Origen: Conejo Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa cruz	Cx43	Nombre: sc-6560 Origen: Cabra o ratón Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz
OC STAMP	Nombre: sc-85340 Origen: Conejo Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa cruz		

## 7.9.1.3 Proteínas de Función de resorción:

<b>Marcador</b>	<b>Anticuerpo</b>
TRAP	Se utiliza para este caso la tinción.
CTSK	Nombre: sc-30056 Origen: Conejo Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca Santa Cruz:
MMP9	Nombre: sc-6841 Origen: Cabra o conejo Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz
ATPvA1	Nombre: sc-14756 Origen: Cabra Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz
CA2	Nombre: sc- 25596 Origen: Conejo Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz
$\alpha\text{V}\beta\text{3}$	Nombre: sc-6627 Origen: Cabra Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz

## 7.9.1.4 Proteínas de Osteoclasto Maduro:

<b>Marcador</b>	<b>Anticuerpo</b>
CT	Nombre: sc- 20743 Origen: Conejo Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz
VDAC1	Nombre: sc- 8828 Origen: Cabra Tipo: IgG Concentración: 1:100 Marca: Santa Cruz

## 7.9.1.5 Otras Proteínas:

<b>Marcador</b>	<b>Anticuerpo</b>
NOX4	Nombre: sc-21860 Origen: Cabra Tipo: IgG Concentración: 1:50 a 1:500 Marca: Santa Cruz

## **7.9.2 Análisis estadístico**

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media de dos o tres experimentos independientes para cada condición experimental. Las diferencias de los grupos de los tratamientos fueron analizadas por el método de ANOVA de una vía con el programa Graph Pad®. Para evaluar el grado de correlación entre las variables se realizó una prueba de correlación de Pearson. El nivel de significancia es del 95% (Alpha = 0.05).

## **8. Aspectos éticos**

Los procedimientos utilizados en este proyecto se hicieron acatando las normas de laboratorio establecidas en la Resolución No. 008430 de 1993 y buenas prácticas clínicas (BPC).

El presente proyecto no incluye el manejo de animales o pruebas en humanos. Se utilizó una línea celular comercial de ATCC® los productos derivados del manejo de esta línea celular y de los diferentes tratamientos momento después de realizar los experimentos, fueron descartados en condiciones especiales, para protección del personal y del medio ambiente que lo rodea, evitando el posible contacto con otros humanos. Los elementos corto punzantes fueron recolectados en contenedores rígidos de paredes impermeables (guardianes); las cajas de cultivo, pipetas, guantes y demás material de laboratorio fueron recolectados en bolsas rojas de material biológico, según las indicaciones establecidas por el Ministerio de la Protección Social (Resolución No. 008430 de 1993), para finalmente ser descartados por la empresa contratada por la Universidad Nacional de Colombia para dicha actividad.

La manipulación del material biológico e inorgánico (plástico y vidrio) produce un impacto de alcance local transitorio, pues contribuye a generar material de desecho para la ciudad que generalmente es quemado (impacto de alcance directo a la capa de ozono) o reciclado (ganancia ecológica). Sin embargo, el impacto ambiental es mínimo o bajo. Solo por la afectación del ozono durante la quema de desechos orgánicos y de incubadoras para el mantenimiento adecuado de las muestras recolectadas. En

conclusión, este proyecto tiene mínimo impacto ambiental y mínimo impacto de riesgo para la salud humana.

Se aclara también que no se hace uso de información confidencial, ni se declaran conflictos de interés, Y que el uso de la información proporcionada por bases de datos especializadas se encontró adecuadamente citada como fuente bibliográfica protegiendo los derechos de autor de acuerdo a la normatividad de citación Vancouver.

## **9. Propiedad intelectual**

El grupo de investigadores respeta los principios sobre propiedad intelectual establecidos por el acuerdo No. 35 de 2003 que expide el reglamento de propiedad intelectual de la Universidad Nacional de Colombia definiendo la misma como un derecho complejo de dominio especial sobre las creaciones, se expresa del talento humano y se concede a los autores o parte de los mismos un principio de respeto y confidencialidad sobre los hallazgos científicos obtenidos por la presente investigación, así como por el apoyo dado por la universidad generado por esta investigación y el apoyo de los estudiante de posgrado, futuros investigadores, inventores y que a la vez permite a la sociedad hacer uso de sus creaciones.

## 10. Resultados

### 1. Los niveles de ROS se modifican con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.

Con el fin de evaluar si cambiar el estado redox de la célula antes o después de fusionar con PEG modifica los niveles de ROS al cuarto día de cultivo, se evaluó la producción de ROS en términos de fluorescencia celular total corregida (CTCF) que es el indicador de intensidad de fluorescencia, en este caso, emitido por el reactivo DHE, que al ser oxidado se intercala con el DNA de la célula tiñendo el núcleo emitiendo fluorescencia de color rojo (576 nm) al ser excitada con una longitud de onda de 480 nm.

Primero se examinaron los efectos de la aplicación de agentes oxidantes y reductores en los niveles de especies reactivas de oxígeno en células U937 sembradas sobre láminas de hueso de origen bovino, sin fusionar y fusionadas con PEG; Se observó que, en las células sin fusionar la aplicación de ambos tipos de tratamientos (oxidante y reductor), posterior a las dos horas de la siembra, y mantenidos en el medio durante cuatro días (Fig. 1A barras Grises Oscuras pg.53), no mostró un cambio significativo en los niveles de ROS comparados con el grupo control al que no se le aplicó ningún tratamiento, sin embargo la sola fusión con PEG, realizada antes de la siembra, generó un aumento del 356% en la cantidad de especies reactivas de oxígeno con respecto a células que no se fusionaron con PEG y fue estadísticamente significativo (\*\*  $P \leq 0.01$ ). Este efecto varió con la aplicación de los distintos reactivos después de la siembra y mantenidos en el medio durante cuatro días posteriores a la fusión con PEG (Fig. 1A barras negras); con respecto al grupo control positivo solo fusionadas con PEG, la aplicación de agentes oxidantes representó un incremento en ROS, donde la HCY presentó efecto más significativo en el incremento de la producción de ROS siendo de 113%, seguido de  $H_2O_2$  con 86% y DMNQ con 45% (\*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ).

**Tabla 1. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno.**

**1.1 NO PEG vs PEG y PEG vs agentes oxidantes.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	↑ 356%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + DMNQ	↑ 45%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + HCY	↑ 113%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑ 86%	**** P ≤ 0.0001

Por su parte los agentes reductores tuvieron un efecto significativo en la disminución de ROS con respecto a PEG solo, siendo del 70% para TROLOX que mostró la disminución estadísticamente más representativa (\*\* P ≤ 0.01), seguido de NAC con 69% y TEMPOL con 68% (\* P ≤ 0.05), GSH+BME solo disminuyó un 29%, a pesar de tener un doble potencial reductor por el BME y GSH; el A.A solamente disminuyó el 1%.

**1.2 PEG vs agentes reductores.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + A.A	↓ 1%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX	↓ 70%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + GSH+BME	↓ 29%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC	↓ 67%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + TEMPOL	↓ 68%	* P ≤ 0.05

Todos los efectos se mantienen similares cuando los reactivos son aplicados 1 día (24 horas) después de la fusión con PEG (Fig. 1A barras gris claro pg.53).

### 1.3 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados 1 día después de la fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	↑ 52%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + HCY1	↑ 121%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	↑ 25%	ns
PEG Solo vs PEG + AA1	↑ 0%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX1	↓ 61%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME1	↓ 34%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC1	↓ 69%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1	↓ 42%	ns

Al aplicar los reactivos en los días 2 y 3 (48 y 72 horas) después de la fusión con PEG, se observa una tendencia por parte de los agentes oxidantes y reductores a mantener niveles de ROS similares al grupo control PEG solo, a pesar de que hay cambios en los porcentajes, solo en el caso de NAC en el día 2 hay valores estadísticamente diferentes cuando se compara con PEG solo.

### 1.4 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados 2 y 3 días después de la fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	↑ 10%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	↑ 14%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY2	↑ 6%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	↑ 24%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	↑ 29%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	↓ 24%	ns
PEG Solo vs PEG + AA2	↓ 10%	ns
PEG Solo vs PEG + AA3	↓ 45%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX2	↓ 13%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX3	↓ 48%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2	↑ 8%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3	↓ 21%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC2	↓ 69%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC3	↓ 34%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2	↓ 7%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3	↓ 21%	ns

Es interesante notar que cuando ambos tratamientos, oxidantes y reductores, fueron aplicados antes de inducir la fusión con PEG (Fig.1A barras blancas pg.53), el resultado fue una disminución en los niveles de ROS, con respecto a PEG solo, para todos los

*Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) * 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.*

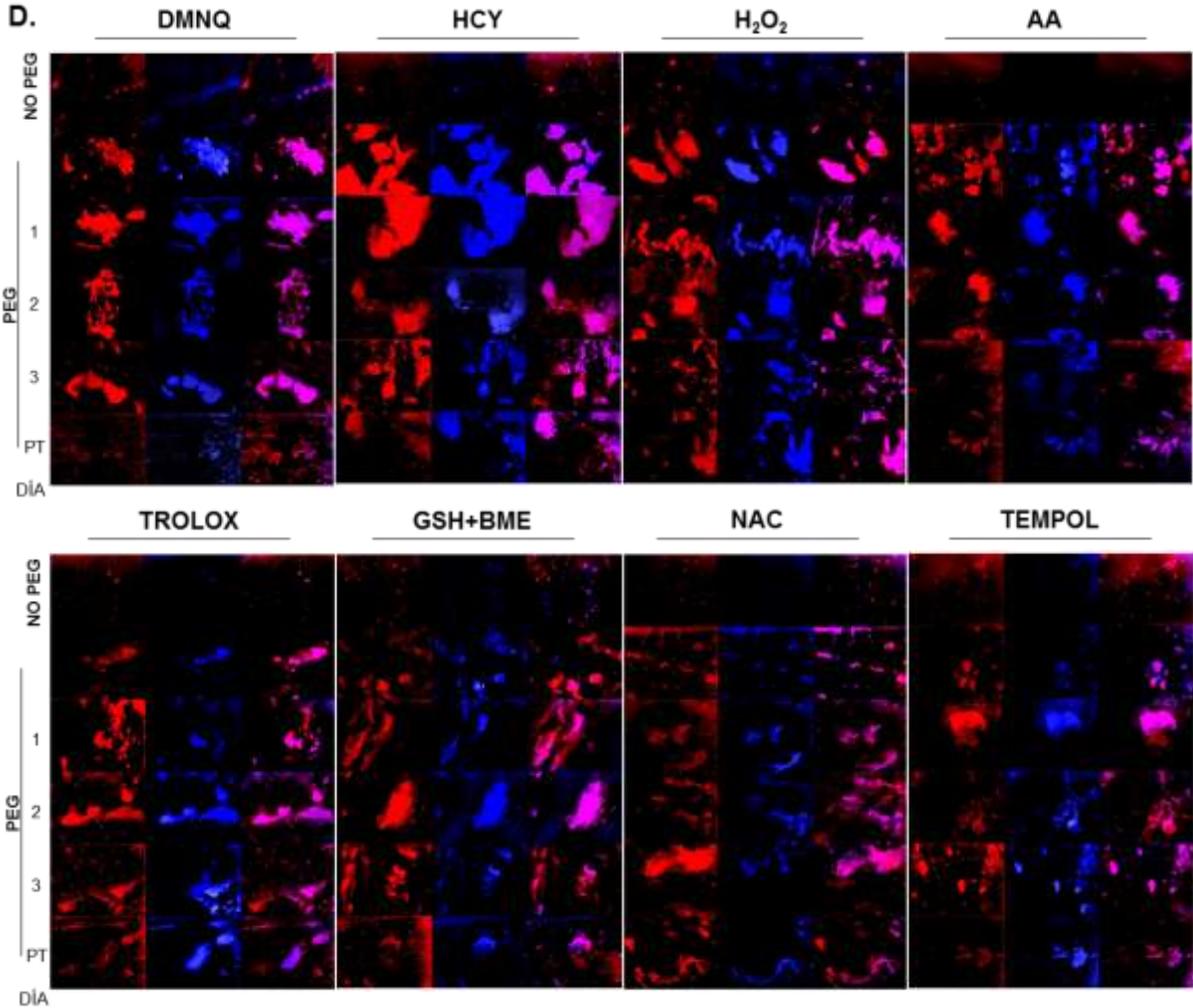
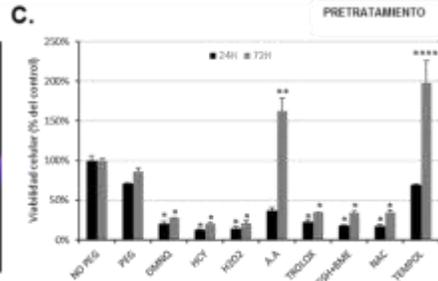
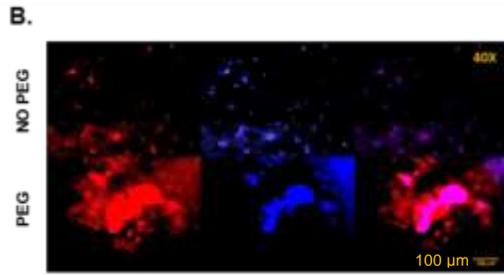
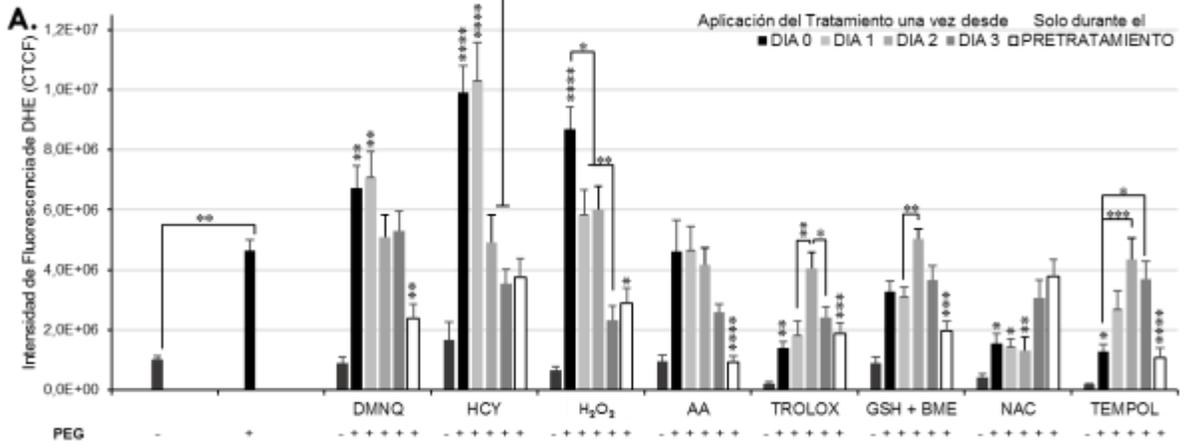
casos, siendo los de mayor efecto estadísticamente significativo, A.A (80%) y TEMPOL (77%) (\*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ).

### 1.5 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	49%	** $P \leq 0.01$
PEG Solo vs PEG + HCYPT	20%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	38%	* $P \leq 0.05$
PEG Solo vs PEG + A.APT	80%	**** $P \leq 0.0001$
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT	60%	*** $P \leq 0.001$
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT	57%	*** $P \leq 0.001$
PEG Solo vs PEG + NACPT	19%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT	77%	*** $P \leq 0.001$

Al realizar una prueba de viabilidad con MTT (Figura 1C pg.53), se observó que tanto la aplicación de agentes oxidantes como reductores disminuyó la viabilidad a las 24 horas, en aproximadamente un 80% (\*  $P \leq 0.05$ ), para todos los casos excepto para el A.A y el TEMPOL con una disminución de un 60% y 30% respectivamente que no fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo control NO PEG que representa el 100% de células vivas. Cuando se evalúa la viabilidad con MTT a las 72 horas, se observa que en todos los grupos permanecen vivas alrededor del 20% de las células (\*  $P \leq 0.05$ ), sin embargo, el A.A y TEMPOL muestran un aumento en la viabilidad alcanzando un porcentaje de células vivas de 163% (\*\*  $P \leq 0.01$ ), y 198% (\*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ) respectivamente con respecto al control NO PEG.

*Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) * 100\%$ , si  $A > B$  = Reducción si  $A < B$  = Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.*



**FIGURA 1. Los niveles de ROS se modifican con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.**

Células U937 fueron pretratadas (PT) antes de la fusión, o fueron tratadas por única vez (días 0, 1, 2 y 3) luego de la fusión con PEG 1450 y, posterior a la fusión, sembradas sobre láminas de hueso, con agentes reductores, A.A (50µg/ml), TROLOX (500µM), GSH (32mM) + BME (25µM), NAC (30mM) y TEMPOL (100µM) o con agentes oxidantes, DMNQ (0.15µM), HCY (100µM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µM). Después de 4 días de cultivo las células fueron tratadas con DHE y hoechst, posteriormente fijadas con paraformaldehído al 3,7% para observar por microscopía de fluorescencia, magnificación 40x, la intensidad media de fluorescencia de DHE en términos de fluorescencia celular total corregida (CTCF), fue cuantificada por el programa Image J. (A) Producción intracelular de ROS según intensidad de fluorescencia de DHE (CTCF) (B) comparando primero el cambio de la aplicación de PEG con respecto a No PEG (C) viabilidad celular con respecto al porcentaje del control NO PEG para el grupo con el pretratamiento (D) cambios en los niveles de ROS con la aplicación de los agentes oxidantes y reductores a diferentes tiempos. Todos los experimentos fueron independientes y realizados por triplicado (duplicado para C), los datos cuantitativos se expresan según la media + error estándar; Dónde, \* P ≤ 0.05 \*\* P ≤ 0.01 \*\*\* P ≤ 0.001 \*\*\*\* P ≤ 0.0001. Para imágenes ampliadas, ver anexo.

## 2. El tamaño de la célula varía con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.

TRAP se expresa en altos niveles en osteoclastos, esta enzima que genera hidrolisis por un mecanismo de ataque nucleofílico para la desfosforilación de las fosfoproteínas de la matriz ósea, y por tanto es un marcador histoquímico para osteoclastos. Se evaluó la presencia de células TRAP+ multinucleadas, que se identifican por presentar una coloración rojo ladrillo o violeta y se caracterizaron además por su tamaño. Se discriminó aquellas células con un área entre 50 y 200  $\mu\text{m}$  y más de 200  $\mu\text{m}$ .

Se observó que el grupo de células que no se fusionaron con PEG, presenta células individuales que no tienen una coloración rojiza y cuyo tamaño no es superior a las 50 $\mu\text{m}$ ; solamente el 20% de la población corresponde a células TRAP + multinucleadas de la que el 1% presenta células de más de 200 $\mu\text{m}$  (Fig. 2A primera barra gris con blanco, B pg.59). Cuando a estas células sin fusionar se le colocaron los agentes oxidantes se observó una tendencia a aumentar la población TRAP + y el número de células de más de 200  $\mu\text{m}$  con respecto a células sin fusionar con PEG (Fig.2C pg.59); sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos. La aplicación de agentes reductores tuvo una tendencia a la disminución del porcentaje total de células TRAP+, en el que TROLOX presentó un porcentaje de diferencia del 71% y GSH+BME de 42% con respecto a NO PEG siendo una disminución significativa en ambos casos (\*  $P \leq 0.05$ ).

**Tabla 2. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la generación de células multinucleadas TRAP positivas.**

### 2.1 NO PEG vs agentes oxidantes y reductores.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs NO PEG + DMNQ	↑ 29%	ns
NO PEG vs NO PEG + HCY	↑ 50%	ns
NO PEG vs NO PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑ 43%	ns
NO PEG vs NO PEG + A.A	↓ 5%	ns
NO PEG vs NO PEG + TROLOX	↓ 71%	* $P \leq 0.05$
NO PEG vs NO PEG + GSH+BME	↓ 42%	* $P \leq 0.05$
NO PEG vs NO PEG + NAC	↓ 39%	ns
NO PEG vs NO PEG + TEMPOL	↓ 39%	ns

Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|)/|A| * 100\%$ , si  $A > B$  = Reducción si  $A < B$  = Aumento, donde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.

Las células fusionadas con PEG, sin aplicar otros tratamientos, al comparar con las células no fusionadas, mostró un aumento del 91% en el total de células TRAP+ y también un aumento en la población de células de más de 200µm, que es estadísticamente muy significativo (\*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ) (Fig.2B). Al fusionar las células con PEG, y aplicar agentes oxidantes, se observó una tendencia a aumentar el porcentaje de células TRAP+ y especialmente de la población de 200µm con respecto a PEG solo (Fig.3C pg.59), el aumento fue del 73% para DMNQ (\*\* $P \leq 0.001$ ), de 49% y 47% para HCY y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente, sin embargo, ambos valores no fueron estadísticamente significativos con respecto a PEG.

### 2.2 NO PEG vs PEG, PEG vs agentes oxidantes.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	91%	**** $P \leq 0.0001$
PEG Solo vs PEG + DMNQ	73%	*** $P \leq 0.001$
PEG Solo vs PEG + HCY	49%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	47%	ns

En lo referente al efecto de los agentes reductores, se encontró una tendencia a la disminución del porcentaje de células TRAP+ multinucleadas, así como a la disminución de la población de más de 200 µm, evidenciando una prevalencia de células de 50 a 200 µm (Fig.2C pg.59), mostraron una disminución significativa del porcentaje de células TRAP + con respecto a PEG solo, GSH + BME con 20%, NAC con 24% y TEMPOL con 35% (\*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ) (Fig.2A primeras barras negras con blanco pg.59).

### 2.3 PEG vs agentes reductores.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + A.A	16%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX	11%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME	20%	**** $P \leq 0.0001$
PEG Solo vs PEG + NAC	24%	**** $P \leq 0.0001$
PEG Solo vs PEG + TEMPOL	35%	**** $P \leq 0.0001$

La aplicación de los agentes oxidantes en los días 1, 2 y 3 mostró una tendencia a la disminución en el porcentaje total de células TRAP+ y de la población de más de 200µm, que hacia el día 3 se asemejaba más al comportamiento de las células fusionadas con PEG, sin otros tratamientos (Fig.2A, C pg.59).

*Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) * 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.*

### 2.4 PEG vs agentes oxidantes aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	45%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	31%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	27%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY1	41%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY2	28%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	26%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	38%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	18%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	29%	ns

Los agentes reductores, por su parte, mostraron comportamientos diferentes, A.A y TROLOX mostraron porcentajes de células TRAP + similares durante todos los días de tratamiento, que no fueron en ningún momento significativamente diferentes a las células fusionadas con PEG, sin otros tratamientos. El TEMPOL produjo la mayor disminución en el porcentaje de células TRAP + cuando fue aplicado en el día 0 pero tuvo una tendencia a aumentar hacia los días 1, 2 y 3 y a alcanzar valores similares a las células fusionadas con PEG, sin otros tratamientos. GSH+BME y NAC presentaron porcentajes bajos de células TRAP+ en los días 0, 1 y 2 así como una menor población de más de 200µm; sin embargo, su aplicación en el día 3 muestra un porcentaje de células TRAP + que no tiene diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células fusionadas con PEG, sin otros tratamientos (Fig.2A, C pg.59).

*Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) \times 100\%$ , si  $A > B$  = Reducción si  $A < B$  = Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.*

### 2.5 PEG vs agentes reductores aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.

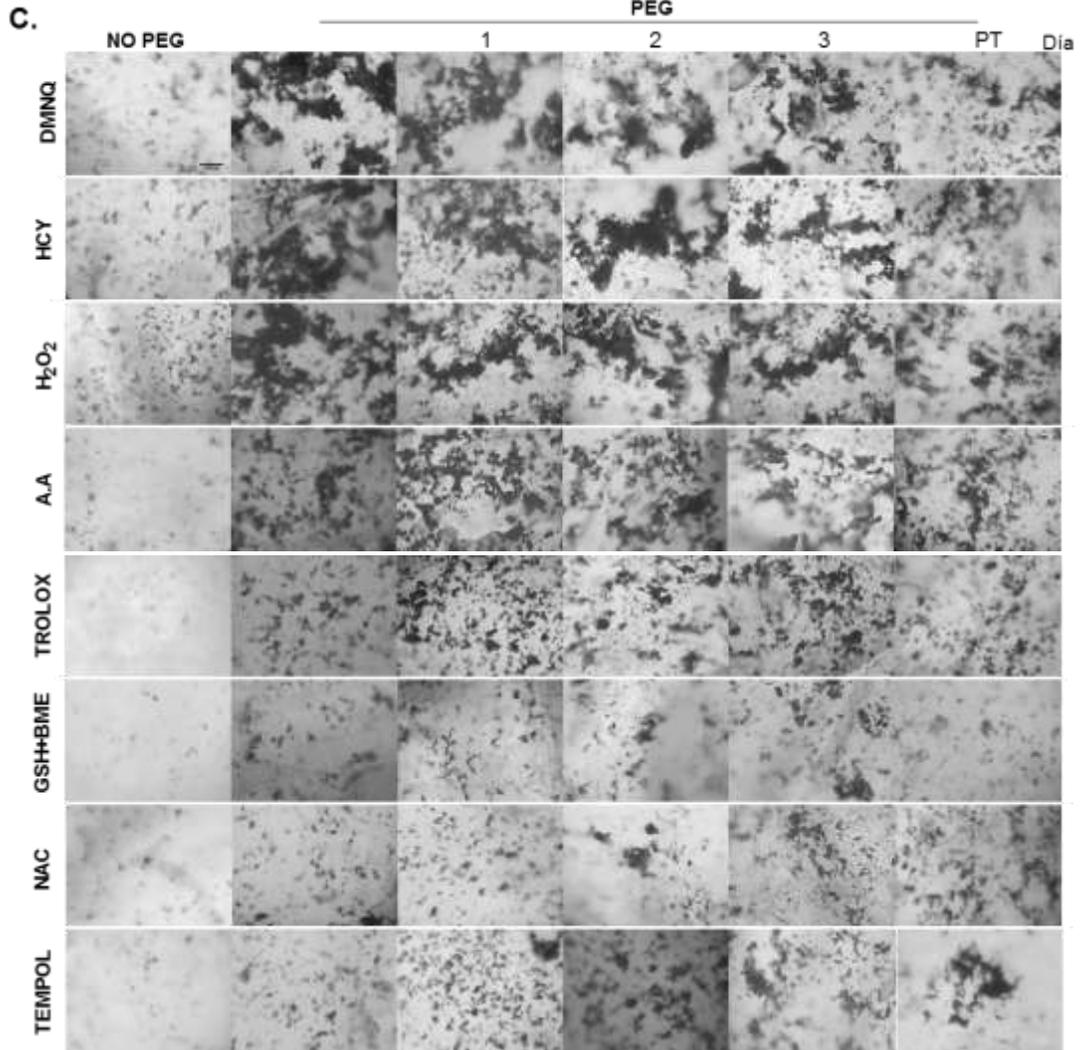
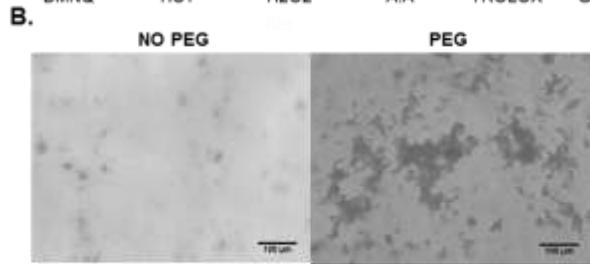
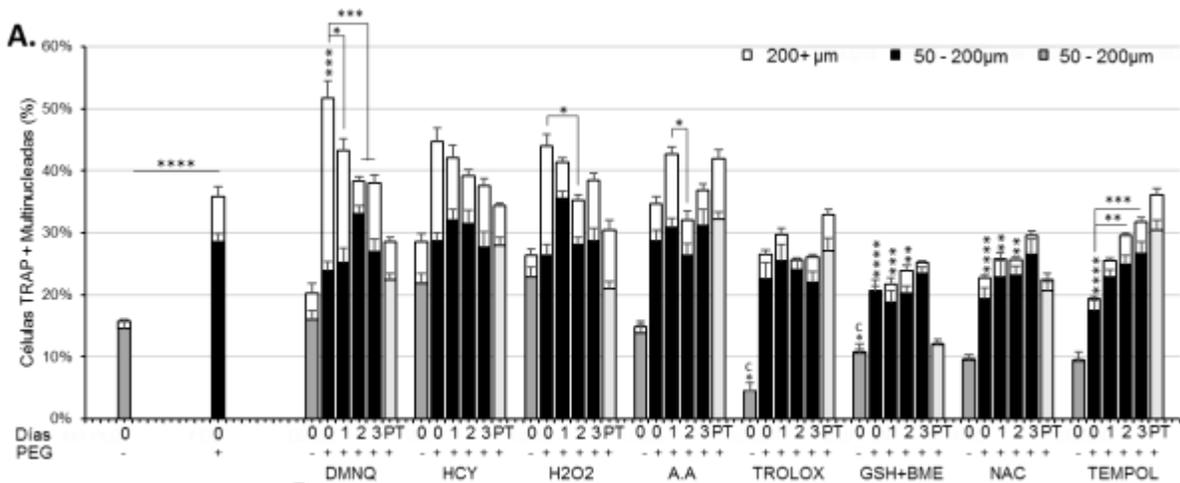
Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + A.A1	↑ 43%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A2	↑ 7%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A3	↑ 35%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX1	↓ 0%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX2	↓ 14%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX3	↓ 13%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 1	↓ 27%	*** P ≤ 0.001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2	↓ 20%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3	↓ 16%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC1	↓ 27%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC2	↓ 14%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC3	↓ 1%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1	↓ 15%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2	↑ 1%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3	↓ 6%	ns

Es importante anotar que el pretratamiento no generó diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células fusionadas con PEG, sin otros tratamientos, para ninguno de los grupos con tratamientos oxidantes o reductores (Fig. 3A barras gris claro pg.59).

### 2.6 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	↓ 5%	ns
PEG Solo vs PEG + HCYPT	↓ 6%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	↓ 2%	ns
PEG Solo vs PEG + A.APT	↑ 40%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT	↑ 10%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT	↓ 24%	ns
PEG Solo vs PEG + NACPT	↓ 25%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT	↑ 21%	ns

Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|)/|A| \times 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.



**FIGURA 2. El tamaño de la célula varía con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.**

Células U937 fueron pretratadas (PT) antes de la fusión, o fueron tratadas por única vez (días 0, 1, 2 y 3) luego de la fusión con PEG 1450 y, posterior a la fusión, sembradas sobre láminas de hueso, con agentes reductores, A.A (50µg/ml), TROLOX (500µM), GSH (32mM) + BME (25µM), NAC (30mM) y TEMPOL (100µM) o con agentes oxidantes, DMNQ (0.15µM), HCY (100µM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µM). Después de 4 días de cultivo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3,7% y teñidas para TRAP con el fin de observar por microscopía de luz, magnificación 40x, (A) Porcentaje total de células multinucleadas TRAP +, barras inferiores representan el porcentaje de células TRAP+ multinucleadas de 50 a 200µm, barras superiores representan el porcentaje de células TRAP+ multinucleadas de más de 200µm(B) comparando primero el cambio de la aplicación de PEG con respecto a No PEG (C) Cambios en los niveles de fusión con la aplicación de los Agentes Oxidantes y Reductores a diferentes tiempos. Todos los experimentos fueron independientes y realizados por triplicado, los datos cuantitativos se expresan según la media + error estándar; Dónde, \* P ≤ 0.05 \*\* P ≤ 0.01 \*\*\* P ≤ 0.001 \*\*\*\* P ≤ 0.0001. Para imágenes en color -ver anexo-.

### **3. La presencia de anillos de actina se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.**

La activación del osteoclasto es importante para el remodelado óseo, este proceso requiere de adhesión celular a la superficie ósea y una reorganización del citoesqueleto de actina para la formación de zonas de sellado y membranas polarizadas esenciales en la secreción direccional de ácidos y enzimas a la superficie que se va a reabsorber. Con el fin de analizar si el cambio en el estado redox de la célula antes o después de fusionarlas con PEG, modifica la reorganización del citoesqueleto, se evaluó la presencia de anillos de actina en las células. Los resultados de este trabajo muestran células que presentan anillos de actina que se caracterizan por presentar una estructura periférica redondeada donde los núcleos se encuentran alrededor de la actina condensada de esta forma.

Se encontró que la fusión con PEG generó un aumento del 904% en el número de células que presentan anillos de actina con respecto a células que no fueron fusionadas con PEG (\*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ) (Fig.3A primera barra negra pg.64). Es interesante anotar que la fusión con PEG en conjunto con la aplicación inmediata de agentes oxidantes, como su aplicación en los días 1, 2 y 3, no generó un cambio significativo en la presencia de anillos de actina con respecto a las células fusionadas con PEG, sin otros tratamientos (aprox. 10%).

**Tabla 3. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la cantidad de osteoclastos que generan anillos de actina.**

**3.1 NO PEG vs PEG, PEG vs agentes oxidantes aplicados en el día 0, 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	904%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + DMNQ	7%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	14%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	8%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	2%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY	7%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY1	5%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY2	18%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	17%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	19%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	2%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	4%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	2%	ns

Sin embargo, los agentes reductores si tuvieron un efecto en la disminución de las células que presentan anillos de actina, siendo los mayores efectos atribuidos a TEMPOL (89%) y GSH + BME (76%) (\*\*\*\* P ≤ 0.0001) (Fig.2 barras negras y grises medias pg.64) mostrando células que se caracterizaron por presentar actina y núcleos que se encuentran distribuidos uniformemente en toda la superficie, lo cual se asocia a la no polimerización del citoesqueleto de actina (Fig. 3C pg.64).

**3.2 PEG vs agentes reductores.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG +A.A	51%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG +TROLOX	57%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME	76%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC	61%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + TEMPOL	89%	**** P ≤ 0.0001

Cuando los agentes reductores se aplicaron el día 1, posterior a la fusión con PEG, solo GSH+BME disminuyó significativamente la presencia de anillos en un 70% con respecto a PEG (\*\* P ≤ 0.01), mientras que los demás agentes reductores disminuyeron al rededor del 50%. La aplicación de agentes reductores en los días 2 y 3 no tuvo un efecto

*Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) \cdot 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.*

significativo en el número de células que presentan anillos de actina con respecto a PEG solo (oscilando entre 10 y 20%) (Fig.3A barras grises de tono medio pg.64).

### 3.3 PEG vs agentes reductores aplicados en el día 1, 2 o 3 después de la fusión con PEG.

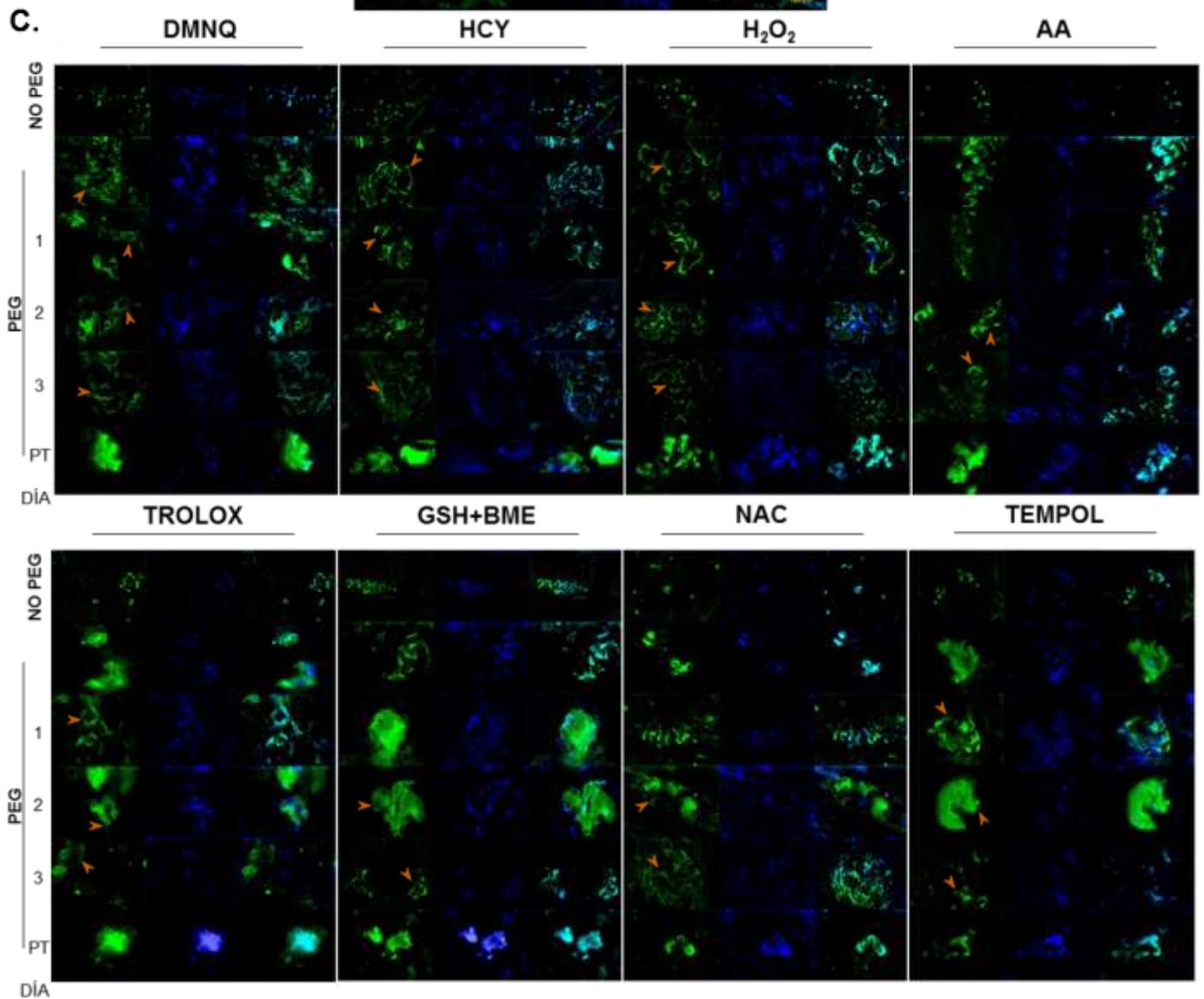
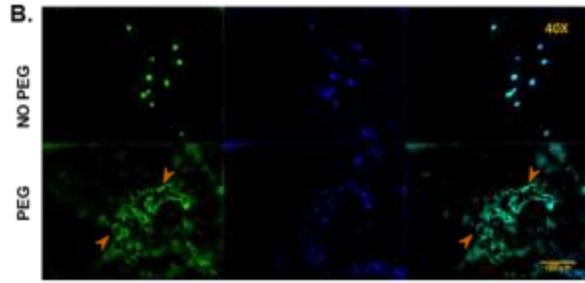
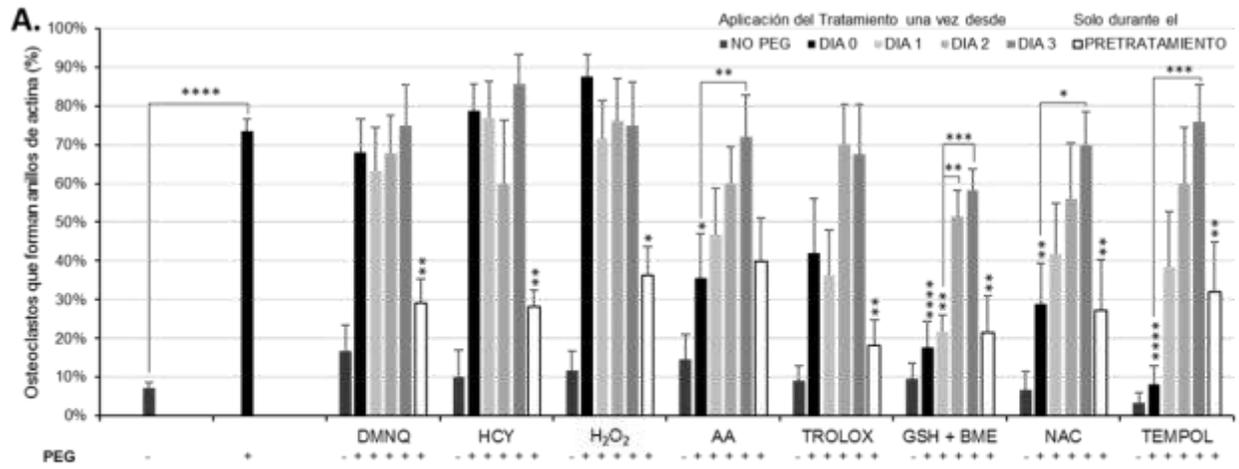
Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + A.A1	36%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A2	18%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A3	2%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX1	51%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX2	4%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX3	2%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 1	70%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2	30%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3	21%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC1	43%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC2	23%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC3	5%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1	48%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2	18%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3	3%	ns

El pretratamiento con oxidantes y reductores una hora antes de la fusión con PEG, generó una disminución estadísticamente significativa del número de células que presentan anillos de actina (\* P ≤ 0.05 y \*\* P ≤ 0.01) Siendo TROLOX el que mayor efecto tuvo, con una reducción del 75% con respecto a PEG solo (Fig. 3A barras blancas pg.64).

### 3.4 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	60%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + HCYPT	62%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	50%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + A.APT	46%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT	75%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT	71%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NACPT	63%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT	56%	** P ≤ 0.01

Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) \times 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.



**FIGURA 3. La presencia de anillos de actina se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen en relación con la fusión con PEG.**

Células U937 fueron pretratadas (PT) antes de la fusión, o fueron tratadas por única vez (días 0, 1, 2 y 3) luego de la fusión con PEG 1450 y, posterior a la fusión, sembradas sobre láminas de hueso, con agentes reductores, A.A (50µg/ml), TROLOX (500µM), GSH (32mM) + BME (25µM), NAC (30mM) y TEMPOL (100µM) o con agentes oxidantes, DMNQ (0.15µM), HCY (100µM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µM). Después de 4 días de cultivo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3,7% y tratadas con falloidina y hoechst para observar por microscopía de fluorescencia, magnificación 40x (A) Porcentaje de células similares a osteoclasto que forman anillos de actina (B) comparando primero el cambio de la aplicación de PEG con respecto a No PEG (C) Cambios en la presencia de anillos de actina con la aplicación de los agentes oxidantes y reductores a diferentes tiempos. Todos los experimentos fueron independientes y realizados por triplicado, los datos cuantitativos se expresan según la media + error estándar; Dónde, \* P ≤ 0.05 \*\* P ≤ 0.01 \*\*\* P ≤ 0.001 \*\*\*\* P ≤ 0.0001

#### **4. La resorción se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen, en relación con la fusión con PEG.**

Para evaluar la capacidad resorptiva de las células U937 que fueron fusionadas con PEG y tratadas con agentes oxidantes o reductores, las células fueron retiradas del hueso y estos teñidos con azul de toluidina al 1%, con el fin de evaluar la presencia de las lagunas de resorción generadas por los osteoclastos y el área promedio.

Al analizar los huesos correspondientes a las células que no fueron fusionadas con PEG, se observó que las áreas de resorción no superaban el 1,3% (Fig.4A barras gris oscuro, B pg.71) al aplicar agentes oxidantes se observó una tendencia a aumentar, sin embargo, la diferencia es de apenas el 1% por lo cual no es estadísticamente significativo, los agentes reductores tampoco tuvieron efecto en modificar el área de resorción (Fig.4A, C pg.71).

Comparando el área de resorción producida por las células fusionadas con PEG, con respecto a las células no fusionadas, se observó un aumento del 1771% registrando áreas con defectos irregulares en la superficie ósea, identificadas en el microscopio al mover el objetivo y observar las distintas capas que la componen, estas áreas en promedio registraron un valor de área total reabsorbida de 35% por mm<sup>2</sup> (Fig. 4B pg.71).

Al fusionar con PEG y tratar con agentes oxidantes pasadas 2 horas de la fusión, se encontró un aumento en el porcentaje de área reabsorbida con respecto a las células fusionadas con PEG sin otro tratamiento, siendo el de mayor efecto el DMNQ con una diferencia del 73%, seguido de HCY con 40% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con un 37% (\*\*\*\* P ≤ 0.0001), de manera contraria los agentes reductores disminuyeron el área reabsorbida con respecto a las células fusionadas con PEG sin otro tratamiento, siendo el de mayor eficiencia el TEMPOL con una diferencia del 79%, seguido de NAC, con 76%, GSH+BME con 74%, TROLOX con 72% y A.A con 67% (\*\*\*\* P ≤ 0.0001) sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 4A barras negras, C pg.71) .

**Tabla 4. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la resorción ósea.**

**4.1 NO PEG vs PEG, PEG vs agentes oxidantes y reductores.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	1771%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + DMNQ	73%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + HCY	40%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + A.A	64%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOX	72%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME	74%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC	75%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL	79%	**** P ≤ 0.0001

Al aplicar los reactivos en los días 1, 2, 3 luego de la fusión con PEG, se observa una tendencia de los agentes oxidantes a disminuir el área reabsorbida con respecto a sus valores en el día 0; con respecto a células fusionadas con PEG, sin tratamiento la aplicación de DMNQ en los días 1 y 2 generó una disminución estadísticamente significativa en un 16% (\*\* P ≤ 0.01) y del 52% para el día 3 (\*\*\*\* P ≤ 0.0001), la aplicación de HCY tuvo un comportamiento similar disminuyendo las áreas reabsorbidas entre un 18% para los días 1 y 2 y 32% para el día 3 (\*\* P ≤ 0.001) con respecto al día 0, sin observarse diferencias significativas con las células fusionadas con PEG sin tratamiento, en el caso del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó entre un 16 para el día 1 y 34% para el día 2 (\*\*\*\* P ≤ 0.0001) en relación al día 0 y sin diferencias significativas con respecto a PEG solo (Fig.4 A barras grises claro, C pg.71).

*Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|)/|A| * 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.*

#### 4.2 PEG o PEG + agentes oxidantes aplicados en el día 0 vs agentes oxidantes aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	45%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	21%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	30%	** P ≤ 0.01
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ1	16%	** P ≤ 0.01
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ2	17%	** P ≤ 0.01
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ3	52%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + HCY1	16%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY2	15%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	5%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY1	18%	*** P ≤ 0.001
PEG + HCY vs PEG + HCY2	18%	*** P ≤ 0.001
PEG + HCY vs PEG + HCY3	32%	*** P ≤ 0.001
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	15%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	10%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	16%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	16%	**** P ≤ 0.0001
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	34%	**** P ≤ 0.0001
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	6%	**** P ≤ 0.0001

Los agentes reductores, durante los días 1 y 2, mostraron niveles de resorción similares a los del día 0. El A.A tuvo una variación del 7 y 23% en relación en los días 1 y 2 con respecto al día 0 de su aplicación y una disminución de la resorción con respecto a las células fusionadas con PEG sin ningún tratamiento del 56% para el día 1 y del 67% para el día 2 (\*\*\*\* P ≤ 0.0001), TROLOX con una variación del 1% al 17% en relación en los días 1 y 2 con respecto al día 0 y una disminución de la resorción del 72% al 77% en los días 1 y 2 con respecto a las células fusionadas con PEG sin ningún tratamiento (\*\*\*\* P ≤ 0.0001), NAC con una variación del 9% al 16% en relación en los días 1 y 2 con respecto al día 0 y una disminución de la resorción del 77% al 79% en los días 1 y 2 con respecto a las células fusionadas con PEG sin ningún tratamiento (\*\*\*\* P ≤ 0.0001), y finalmente TEMPOL con una variación del 18 al 42% en relación en los días 1 y 2 con respecto al día 0 y una disminución de la resorción del 69% al 75% en los días 1 y 2 con respecto a las células fusionadas con PEG sin ningún tratamiento (\*\*\*\* P ≤ 0.0001); GSH+BME tuvo un comportamiento en el que la tendencia es el de aumentar el área reabsorbida en función al tiempo. Para el día 3 los agentes reductores aumentaron el área de resorción con respecto a los días anteriores, pero se encontró disminuida con respecto al control PEG (Fig. 4 Barras grises de tono medio, C pg.71).

*Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) \times 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, dónde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.*

### 4.3 PEG o PEG + agentes reductores aplicados en el día 0 vs agentes oxidantes aplicados en los días 1, 2 y 3 después de la fusión con PEG.

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + A.A1	67%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + A.A2	56%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + A.A3	22%	* P ≤ 0.05
PEG + A.A vs PEG + A.A1	7%	ns
PEG + A.A vs PEG + A.A2	23%	ns
PEG + A.A vs PEG + A.A3	119%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOX1	72%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOX2	77%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOX3	40%	*** P ≤ 0.001
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX1	1%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX2	17%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX3	112%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME1	61%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2	39%	*** P ≤ 0.001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3	24%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG +	50%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG +	134%	**** P ≤ 0.0001
PEG + GSH+BME vs PEG +	189%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC1	77%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC2	79%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC3	46%	**** P ≤ 0.0001
PEG + NAC vs PEG + NAC1	9%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC2	16%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC3	112%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1	75%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2	69%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3	41%	**** P ≤ 0.0001
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL1	18%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL2	47%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL3	184%	**** P ≤ 0.0001

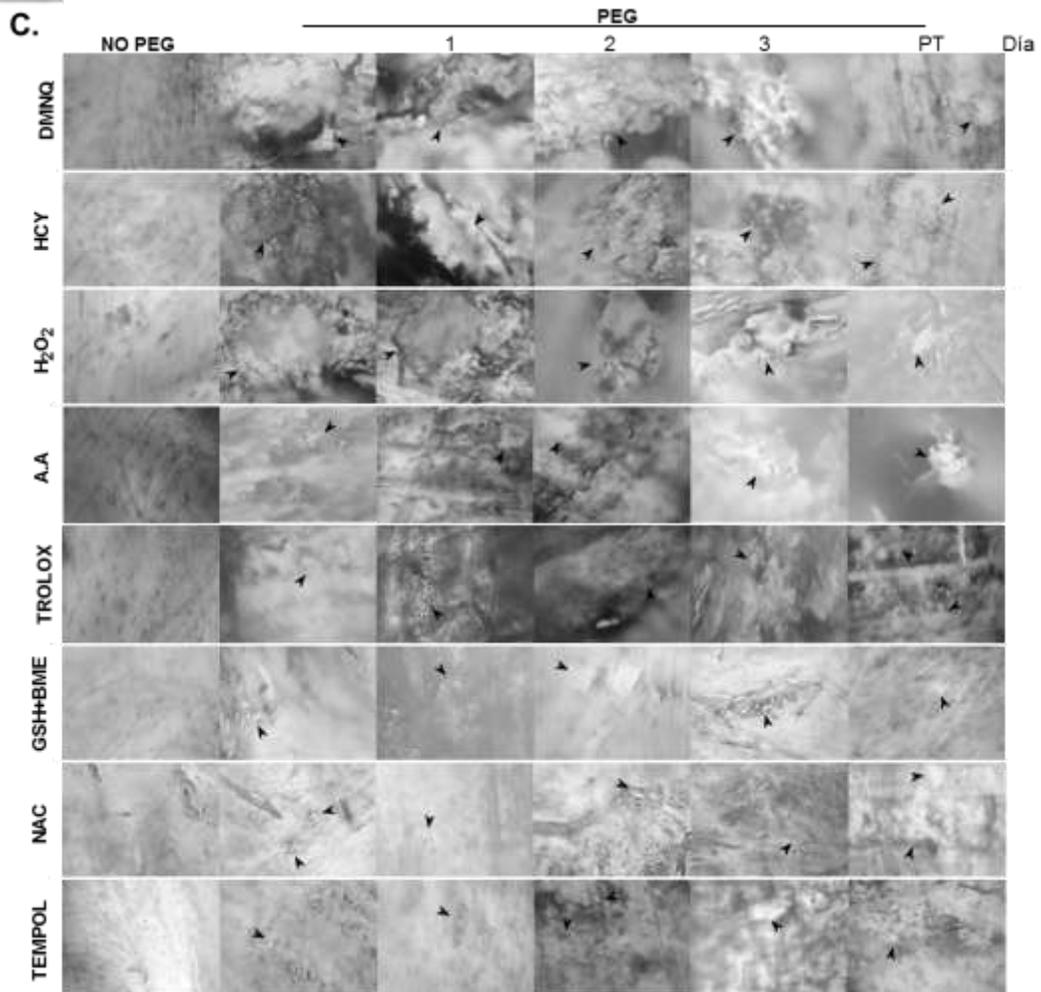
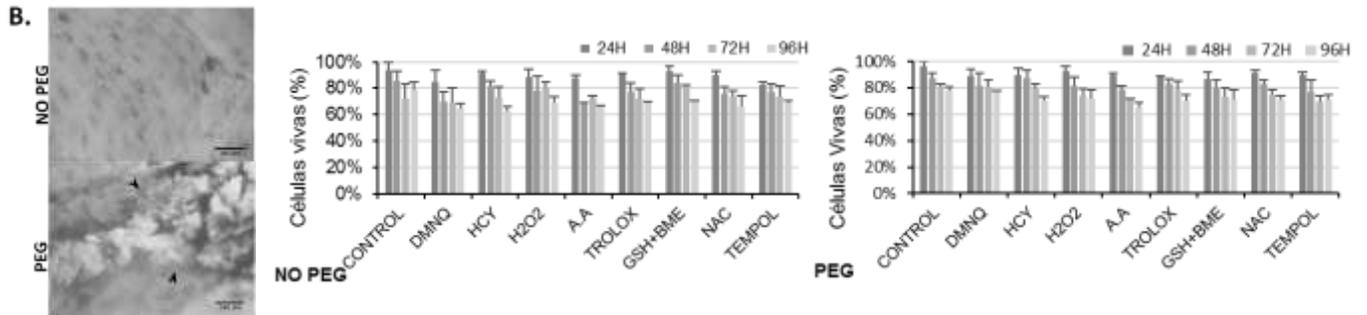
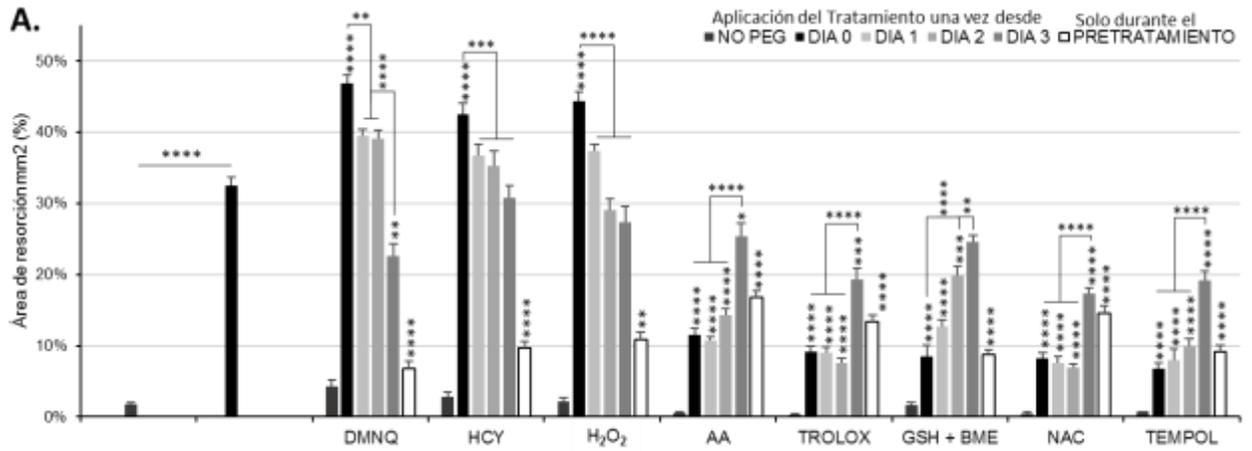
Para todos los casos el pretratamiento inhibió la resorción con respecto a las células fusionadas con PEG sin ningún tratamiento, donde, DMNQ inhibió en un 79%, HCY en 70%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 67%, A.A en 48%, TROLOX en 59%, GSH+BME en 59%, NAC en 55% y TEMPOL en 72% (\*\*\*\* P ≤ 0.0001) (Fig. 4 Barras blancas, C pg.71).

Tablas: El número a un lado del nombre del reactivo (oxidante o reductor) denota el día en el que fue aplicado por única vez después de la fusión con PEG (1 día, 2 días o 3 días) y mantenido en el medio por los días siguientes hasta completar cuatro (4) días de cultivo después de inducir fusión; PT: Pretratamiento, el reactivo fue aplicado únicamente durante una hora y posteriormente lavado antes de realizar la fusión con PEG; Diferencia de porcentaje:  $(|B-A|/|A|) * 100\%$ , si A>B=Reducción si A<B=Aumento, donde A: valor de referencia, B: valor con el que se compara (vs); Para ver la tabla completa, con las comparaciones entre días ver anexos.

**4.4 PEG vs agentes oxidantes y reductores aplicados previa fusión con PEG.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	79%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + HCYPT	70%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	67%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + A.APT	48%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT	59%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT	59%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NACPT	55%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT	72%	**** P ≤ 0.0001

Para confirmar que los cambios en la resorción no se deben a cambios en la supervivencia de las células, se realizó viabilidad con azul de tripán durante 4 días del cultivo, para las células no fusionadas, o fusionadas con PEG, y con cada uno de los oxidantes o reductores aplicados 2 horas después de la siembra. Se observó que las células no fusionadas presentaron similar viabilidad con respecto a los tratamientos, aunque los reactivos disminuyeron en promedio un 10% de la viabilidad para el cuarto día.



**FIGURA 4. La resorción se modifica con agentes oxidantes y reductores dependiendo del momento que se apliquen en relación con la fusión con PEG.**

Células U937 fueron pretratadas (PT) antes de la fusión, o fueron tratadas por única vez (días 0, 1, 2 y 3) luego de la fusión con PEG 1450 y, posterior a la fusión, sembradas sobre láminas de hueso, con agentes reductores, A.A (50µg/ml), TROLOX (500µM), GSH (32mM) + BME (25µM), NAC (30mM) y TEMPOL (100µM) o con agentes oxidantes, DMNQ (0.15µM), HCY (100µM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50µM). Después de 4 días de cultivo las células fueron fijadas con paraformaldehído al 3,7% y posteriormente retiradas con un cepillo de cerdas suaves; los huesos libres de células fueron teñidos con azul de toluidina para observar por microscopía de luz, magnificación 40x, (A) Porcentaje de área reabsorbida por milímetro cuadrado (B) comparando primero el cambio de la aplicación de PEG con respecto a No PEG (C) Cambios en los niveles de resorción con la aplicación de los Agentes Oxidantes y Reductores a diferentes tiempos (D) Porcentaje de células vivas, cómo resultado de prueba de viabilidad con azul tripán, evaluado a las 24, 48, 72 y 96 horas para cada uno de los tratamientos oxidantes o reductores solos o 2 horas después de la fusión con PEG. Todos los experimentos fueron independientes y realizados por triplicado, los datos cuantitativos se expresan según la media + error estándar; Dónde \* P ≤ 0.05 \*\* P ≤ 0.01 \*\*\* P ≤ 0.001 \*\*\*\*P ≤ 0.0001, para ver las imágenes en color, ver anexo.

**5. Los marcadores osteoclastogénicos se expresan de diferente manera con agentes oxidantes y reductores cuando son aplicados en etapas iniciales de la fusión con PEG.**

**Tabla. 5 Lista de marcadores osteoclásticos analizados y su función.**

NFκB	Factor de transcripción para el inicio de la diferenciación hacia osteoclastos.
NFATc1	Factor de transcripción para genes específicos del osteoclasto.
ERVW-1	Sincitina 1 - Acercamiento de las membranas de los compañeros de fusión por un cambio conformacional.
CD47	Reconocimiento entre compañeros de fusión, incrementa el calcio intracelular.
DC STAMP	Modula capacidad de fusión de los OC.
OC STAMP	Modula capacidad de fusión de los OC.
ADAM 12	Inicia la fusión por unión con la integrina $\alpha 9\beta 1$ de otra célula modificando el citoesqueleto.
CDH1	E-Cadherina, proteína de adhesión célula a célula dependiente de calcio inicia modificación del citoesqueleto.
CX43	Genera uniones GAP para permitir comunicación intercelular.
$\alpha V\beta 3$	Integrina $\alpha V\beta 3$ , genera la adhesión del borde en cepillo con la matriz extracelular del hueso.
CA2	Hidratación del dióxido de carbono para generar protones H <sup>+</sup> y aumentar el pH.
ATPvA1	Bomba de protones para acidificar la matriz extracelular.
MMP9	Media proteólisis del colágeno la matriz extracelular.
CTSK	Media proteólisis del colágeno y la elastina de la matriz extracelular, activa a MMP9 y TRAP.
CTR	Mantiene la homeostasis del calcio para regular las tasas de resorción del OC, su activación inhibe resorción.
VDAC	Porina de la membrana mitocondrial para la difusión de sustancias hidrofílicas - iones de calcio, media la salida de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> de la mitocondria al citosol.
NOX 4	Cataliza la transformación del oxígeno a especies reactivas de oxígeno, de membrana citoplasmática y mitocondrial.

Para determinar si las células fusionadas con PEG y tratadas con agentes oxidantes o reductores expresan marcadores específicos de osteoclasto, tanto de maduración como de actividad, se realizó una inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos para evaluar el porcentaje de osteoclastos FITCI + y determinar la expresión del marcador según la intensidad de fluorescencia emitida por el FITC en términos de CTCF.

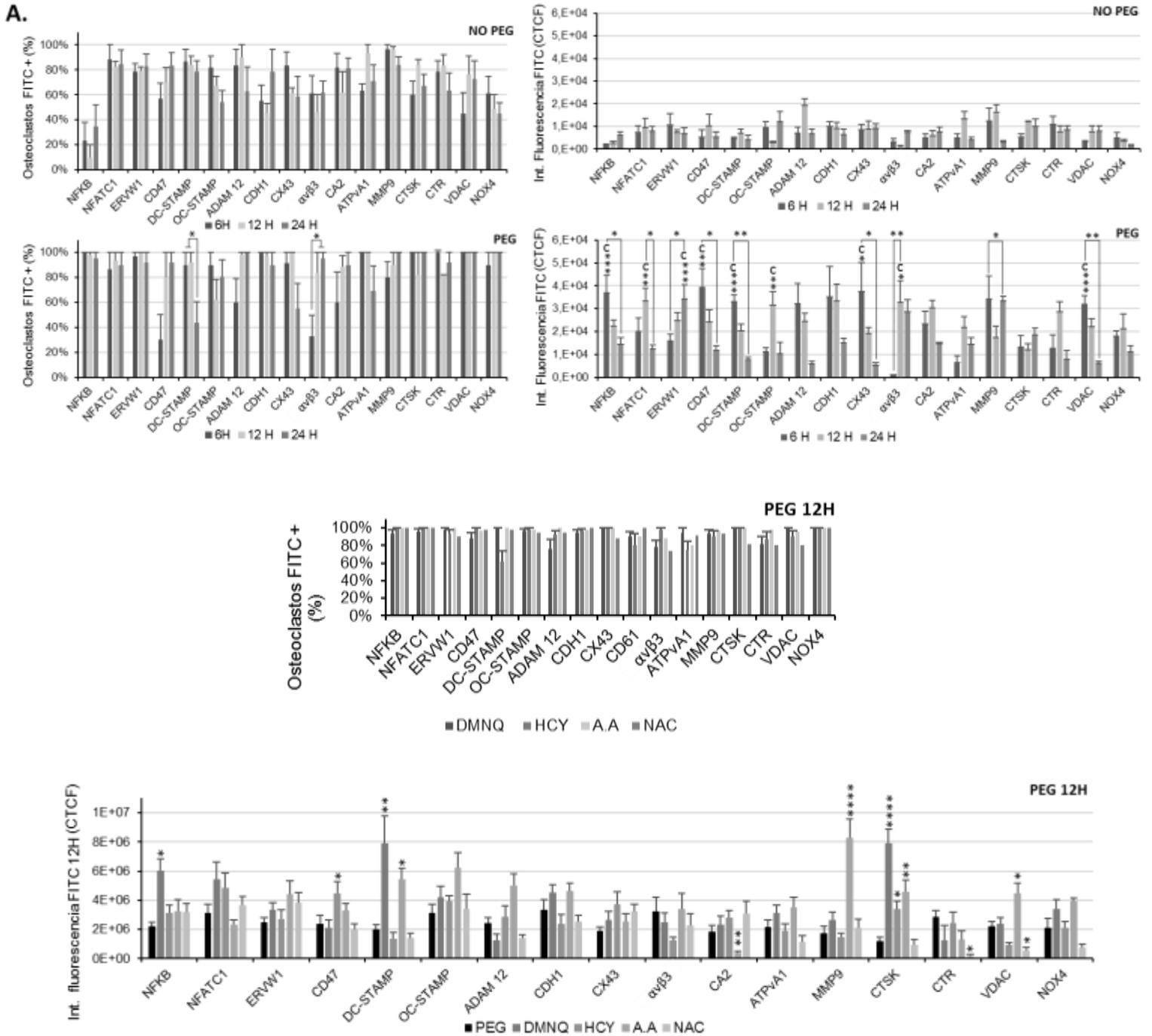
Los experimentos se realizaron en dos etapas, en la primera se compararon los cambios de la expresión de marcadores a las 6, 12 y 24 horas después de la siembra con o sin

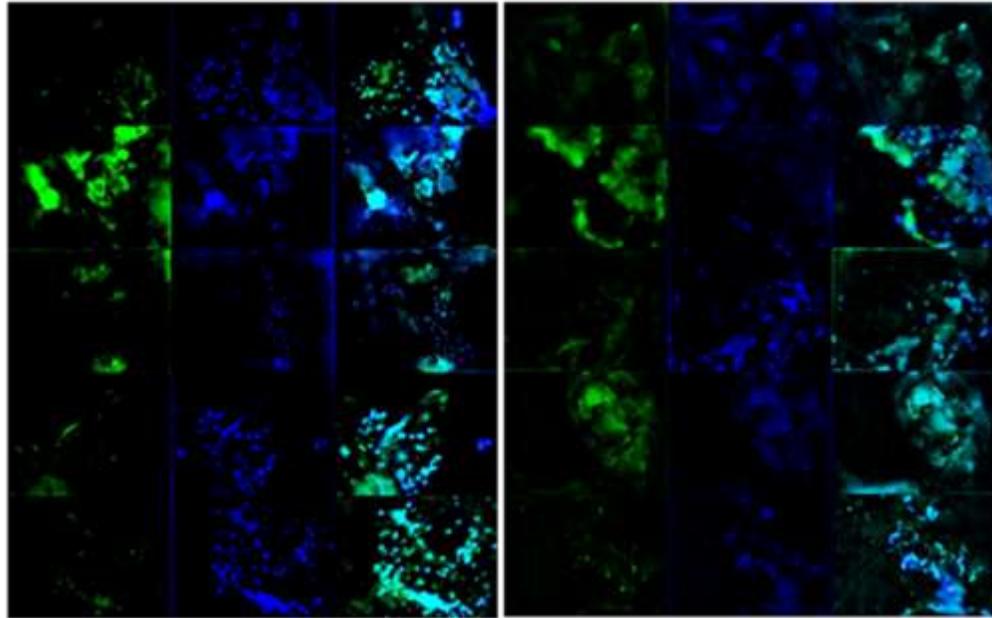
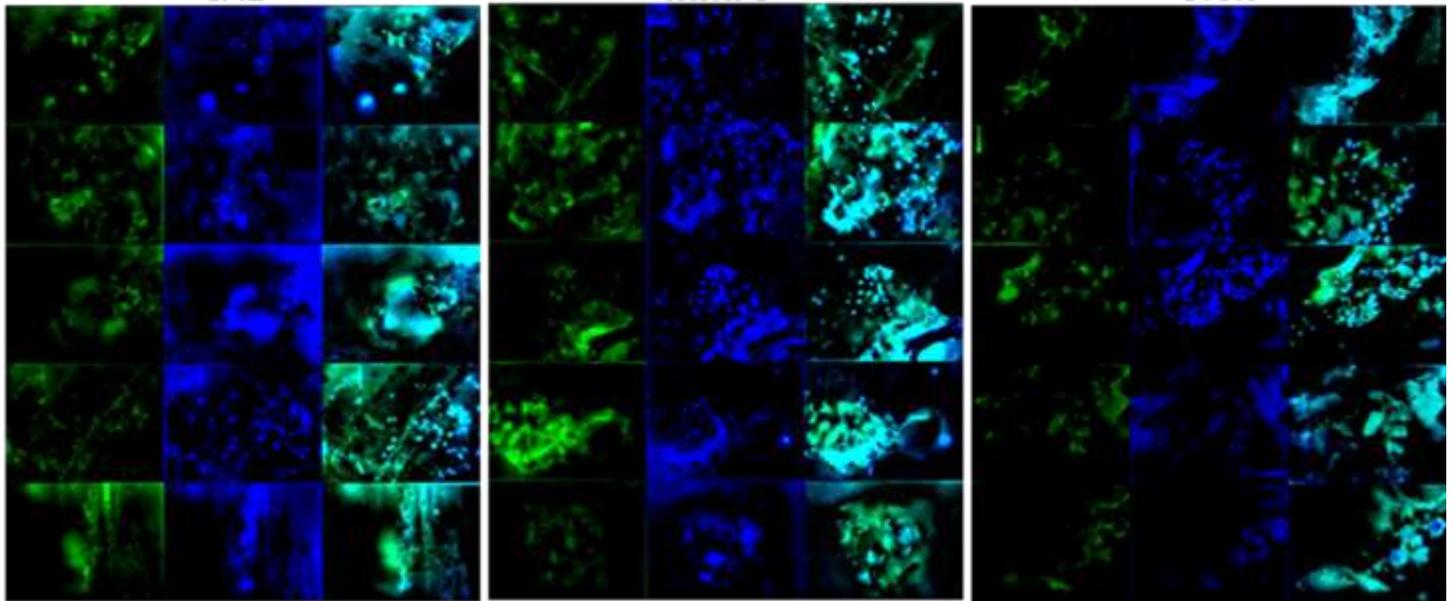
PEG, y en la segunda etapa se aplicaron agentes oxidantes o reductores que tuvieron la mayor y la menor eficacia en alterar la resorción.

Las células no fusionadas se observaron positivas para los distintos marcadores, a excepción de NF $\kappa$ B y NOX4 cuya presencia se encontró en menos del 60% de la población total de células; no obstante, cuando se midió la intensidad de fluorescencia se observaron niveles muy bajos que no mostraron cambios significativos para ninguno de los tiempos indicados, 6, 12 o 24h (Fig.5A pg.75). Cuando las células fueron fusionadas con PEG se observaron positivas para todos los casos, a excepción de CD47 y  $\alpha$ V $\beta$ 3 con un porcentaje de células positivas menor al 40%, los marcadores mostraron intensidades diferentes; a las 6 horas de la fusión con PEG, aumentaron con respecto a las células no fusionadas, la intensidad de fluorescencia de NF $\kappa$ B (\*\* P  $\leq$  0.01), CD47 (\*\* P  $\leq$  0.01), DC-STAMP (\*\*\*\*P  $\leq$  0.0001), CX43 (\* P  $\leq$  0.05) y VDAC (\*\* P  $\leq$  0.001), a las 12 horas aumentaron NFATc1 (\*\* P  $\leq$  0.01), OC-STAMP (\*\* P  $\leq$  0.001),  $\alpha$ V $\beta$ 3 (\* P  $\leq$  0.05), que además aumentó el número de células positivas, y finalmente a las 24 horas aumentó la intensidad de fluorescencia de ERVW1 (\*\* P  $\leq$  0.001). Los demás marcadores, pese a que tuvieron una tendencia a aumentar, no mostraron cambios significativos con respecto a células no fusionadas. En razón a que la mayoría de marcadores, característicos de osteoclastos, se elevaron al fusionar con PEG a las 12 horas, se analizó los reactivos que más efecto tuvieron sobre la resorción: DMNQ que aumentó y NAC que disminuyó; igualmente, los que menos efecto tuvieron: HCY que aumentó y A.A que disminuyó (Fig. 5 B).

Al aplicar DMNQ, hubo un aumento significativo de NF $\kappa$ B (\* P  $\leq$  0.05), DC-STAMP (\*\* P  $\leq$  0.01) y CTSK (\*\*\*\*P  $\leq$  0.0001), mientras que la HCY solo tuvo aumentos estadísticamente significativos en la expresión de CD47 (\* P  $\leq$  0.05) y de CTSK (\* P  $\leq$  0.05), con respecto a las células fusionadas con PEG, sin tratamiento.

El A.A generó un aumento en la expresión de DC-STAMP (\* P  $\leq$  0.05), MMP9 (\*\*\*\*P  $\leq$  0.0001), CTSK (\*\* P  $\leq$  0.01) y VDAC (\* P  $\leq$  0.05), no obstante, disminuyó significativamente CA2 (\*\* P  $\leq$  0.01) con respecto a las células fusionadas con PEG, sin tratamiento. NAC disminuyó significativamente CTR (\* P  $\leq$  0.05) y VDAC (\* P  $\leq$  0.05) y los demás marcadores analizados no mostraron cambios con respecto a las células fusionadas con PEG, sin tratamiento (Fig. 5B, C).



**C.****NFKB****DC-STAMP**PEG  
DMNQ  
HCY  
A.A  
NAC**CA2****MMP9****CTSK**PEG  
DMNQ  
HCY  
A.A  
NAC

**FIGURA 5. Los marcadores osteoclastogénicos se expresan de diferente manera con agentes oxidantes y reductores cuando son aplicados en etapas iniciales de la fusión con PEG.**

Células U937 fueron fusionadas con PEG 1450 y posteriormente sembradas sobre láminas de hueso y fijadas a diferentes tiempos (6, 12 o 24 horas) para la evaluación de la expresión de marcadores osteoclastogénicos, NF $\kappa$ B, NFATc1, ERVW1, CD47, DC-STAMP, OC-STAMP, ADAM 12, CDH1, CX43, CD61, CA2, ATPva1, MMP9,CTSK, CTR, para evaluar biogénesis mitocondrial VDAC y NOX4 como marcador de potencial de producción de ROS, las células fueron fijadas y tratadas con anticuerpos primarios para cada marcador y posteriormente con anticuerpos secundarios conjugados con FITC para observar por microscopía de fluorescencia, magnificación 40x (A) Porcentaje de Osteoclastos FITC + e Intensidad de fluorescencia de FITC (CTCF) medidas a las 6, 12 o 24 horas después de la siembra. (B) Porcentaje de Osteoclastos FITC + e Intensidad de fluorescencia de FITC (CTCF) medidas a las 12 horas con la aplicación de PEG solo o con agentes oxidantes, DMNQ (0.15 $\mu$ M) u Homocisteína (100 $\mu$ M), o agentes reductores, Ácido Ascórbico (50 $\mu$ g/ml) o NAC (30mM). (C) Cambios en la intensidad de fluorescencia de los marcadores más alterados por la aplicación de los agentes oxidantes o reductores.

Todos los experimentos fueron independientes y realizados por triplicado, los datos cuantitativos se expresan según la media + error estándar; Dónde, \* P  $\leq$  0.05 \*\* P  $\leq$  0.01 \*\*\* P  $\leq$  0.001 \*\*\*\* P  $\leq$  0.0001, c: con respecto al control sin PEG.

## 11. Discusión

Trabajos previos en el laboratorio (1-3) mostraron que la fusión con PEG de células U937 genera aumento de los niveles de ROS hacia las 10 horas, de manera similar a lo descrito en la literatura cuando se aplica MCSF y RANKL. El aumento de ROS es esencial para adquirir características similares a osteoclasto (70,73-84). El propósito de este trabajo fue investigar los cambios en la actividad osteoclastogénica al aplicar distintos agentes oxidantes y reductores a células fusionadas con PEG. Se buscó determinar si la actividad osteoclastogénica desencadenada por la fusión con PEG se modifica al tratar las células con agentes reductores u oxidantes antes o después de la fusión con PEG. Se buscó deducir si la condición oxidativa o reductora de la célula altera la actividad osteoclástica. Específicamente, inferir el papel de la fusión en la actividad osteoclástica cuando la célula se trata con agentes reductores u oxidantes antes o después de fusionar con PEG. Para esto, se evaluó la presencia de ROS por medio de inmunofluorescencia midiendo la intensidad de fluorescencia de DHE, se realizó tinción para TRAP, se clasificaron las células de 50 a 200  $\mu\text{m}$  y de más de 200  $\mu\text{m}$ , se analizó la presencia de anillos de actina, se evaluó las lagunas de resorción generadas por los osteoclastos y finalmente se analizó la expresión de marcadores específicos de osteoclastos.

Se observó que la fusión con PEG induce actividad oxidativa lo que generó un aumento de ROS, aumento del porcentaje de células TRAP +, la formación de anillos de actina y el área resorbida. Cuando se aplican agentes oxidantes en el día 0 y 1 aumenta la generación de ROS, el porcentaje de células TRAP + de más de 200  $\mu\text{m}$  y el área de resorción, con respecto a las células fusionadas con PEG y sin otros tratamientos. La generación de ROS se reduce cuando se aplican agentes reductores, lo que resulta también en una disminución en el porcentaje de células TRAP +, formación de anillos de actina y el área resorbida. Estos resultados sugieren que la fusión celular *per se* activa ROS, aunque los resultados no permiten diferenciar el mecanismo, la literatura ha reportado que durante la fusión celular ocurre el ensamblaje y activación de las enzimas NOX1 y NOX 2, que son generadoras de ROS (151-153).

Se puede especular que la activación y producción de ROS puede inducir la actividad enzimática necesaria para la actividad característica del osteoclasto como la actividad TRAP + y NFκB facilitando la estabilización de la fusión celular, explicando el hallazgo de células con tamaños superiores a 200 μm y a su vez esto se relaciona con el aumento en la actividad resorptiva, aunque los resultados presentes no permiten diferenciar el mecanismo. En la literatura se reporta que alterar el equilibrio redox de los precursores osteoclásticos, disminuyendo ROS, se disminuye la capacidad de la célula para la reorganizar el citoesqueleto (154,155) y esto induce a que, durante la diferenciación, los osteoclastos fallan en consolidar la fusión, formar anillos de actina y unirse al hueso para iniciar la resorción (156). Este evento se atribuye a que en la cascada de señalización que activan los factores de transcripción osteoclastogénicos, entre ellos NFκB, se requiere de la activación de las proteínas Src (157) que es dependiente de su oxidación, resaltando la importancia del estado oxidativo celular. Adicionalmente Src media también los eventos de polimerización y despolimerización de actina a través de la activación de proteínas Rac 1(9). Nuestro laboratorio ha reportado que Src y Pyk se activan en células fusionadas con PEG (3).

Al evaluar los marcadores osteoclastogénicos en este modelo, se observó que NFκB y NFATc1 aumentan en células fusionadas con PEG, respecto al número de células y la intensidad de fluorescencia al comparar con las células no fusionadas (\*\* P ≤ 0.01), Igual sucede con CD47 (\*\* P ≤ 0.01), DC-STAMP (\*\*\*\*P ≤ 0.0001), CX43 (\* P ≤ 0.05) , implicadas en la fusión, y VDAC (\*\* P ≤ 0.001), todas proteínas que se expresan por acción de NFκB (18,27), estas a su vez aumentan al aplicar reactivos oxidantes. Por otro lado, se conoce que NFκB estimula la generación de ROS (74,158, 153) mientras VDAC es un regulador dinámico o regulador de la función mitocondrial global tanto en aumento o disminución de ROS (158). Se ha reportado que un ambiente reductor, al disminuir ROS, genera la disminución en la activación de la vía NFκB en osteoclastos (95-97,159) confirmando que las vías de señalización osteoclastogénicas requieren un ambiente pro oxidante para su activación.

La aplicación del agente oxidante DMNQ, luego de la fusión con PEG, tuvo el mayor efecto en aumentar el porcentaje de células TRAP+ de más de 200 μm y en aumentar el área resorbida con respecto al grupo de células fusionadas con PEG y

sin otros tratamientos. La aplicación del agente reductor TEMPOL, tuvo el mayor efecto en disminuir el porcentaje general de células TRAP + y en disminuir la resorción; la literatura refiere que en cultivo ambos DMNQ y TEMPOL, tienen capacidad de regenerarse haciendo uso de enzimas de la célula, por lo cual su acción se mantiene durante el tiempo de cultivo, como en este caso que fue de 4 días (122,137), aunque esto no se midió en este experimento, sugiere que un estímulo prolongado en etapas tempranas después de la fusión con PEG tiene mejor eficiencia en alterar las vías de señalización implicadas en fusión.

Cuando se aplicaron los agentes oxidantes y reductores 2 y 3 días después de la fusión con PEG, tuvieron menor efecto en modificar los niveles de ROS, los porcentajes de células TRAP +, la formación de anillos de actina y la actividad resorptiva cuando se comparan con el grupo de células fusionadas con PEG que no recibieron tratamientos.

Esto sugiere que cuando la fusión se encuentra consolidada en los días 2 y 3 después de la aplicación de PEG, alterar el estado redox de la célula no modifica drásticamente los niveles de ROS y no es determinante para alterar la actividad resorptiva. Implica que, para esta etapa, el estado redox se mantiene dentro de un umbral regulado que permite la función celular, a pesar de que los resultados presentes no evalúan los umbrales de ROS ni su alteración. En la literatura se ha reportado que la aplicación de  $H_2O_2$  en varios tipos de células diferenciadas, provenientes de células madre mesenquimales, no genera cambios en las concentraciones intracelulares de ROS, como si ocurre cuando se aplica directamente en las células madre (160). En este caso los autores sugieren que la célula mantiene niveles regulares de ROS dependiendo de su estado fisiológico; este evento se asocia al balance en la relación  $NAD^+/NADH$  que se requiere para el metabolismo celular (161), ya que este depende del estado redox de la célula, una alteración en esta relación, genera la producción de peroxisomas con enzimas oxidantes (NOX) o antioxidantes (catalasas) que permiten mantener los niveles adecuados de  $NAD^+$  y  $NADH$  para los requerimientos metabólicos de la célula (161,162,163).

Al colocar los reactivos oxidantes o anti-oxidantes antes de la fusión con PEG, los niveles de ROS, el porcentaje y tamaño de células TRAP +, la formación de anillos de actina y especialmente la resorción, muestran una tendencia hacia la disminución con respecto a las células fusionadas sin otros tratamientos; la prueba de viabilidad con MTT mostró que estos resultados se atribuyen a muerte celular, sugiriendo que los niveles de ROS son críticos para la estabilidad no solo de la fusión sino de la viabilidad (74,89). Es probable que al pretratar las células con reactivos oxidantes o reductores y luego fusionar las células con PEG, se altere demasiado el equilibrio redox, por tanto, el umbral tolerable, induciendo mecanismos de muerte desencadenados en parte por la fusión celular con PEG. A pesar de que no se han reportado resultados similares en la literatura, se sabe que un umbral en la cantidad de ROS de la célula, así como la relación GSH/GSSG (6,94), que varía según el tipo de célula, es requerido para que se mantengan vías implicadas en proliferación y supervivencia (163). Esto concuerda con un estudio en células U937 en el que se observa que un estímulo corto de ROS promueve la fosforilación de las MAPK responsables de la supervivencia de la célula. Sin embargo, la inducción continua de ROS o altos niveles de ROS causan su apoptosis, por lo que, como respuesta se induce Nrf2 aumentando la expresión de genes HO1 y NQO1 dependientes de la activación de ERK y AKT disminuyendo los niveles de ROS intracelulares (161). Este trabajo arroja resultados similares a los de un estudio que analiza la actividad de TROLOX, en el cual se observó que el pretratamiento con 100 $\mu$ M (la misma de este estudio) durante 3 horas antes de la aplicación de RANKL en monocitos derivados de médula ósea reguló negativamente la expresión de c-Fos disminuyendo la cantidad de osteoclastos por pozo, no obstante, no realizan pruebas de viabilidad (117). No hay otros reportes en la literatura que realicen pretratamiento con agentes oxidantes o reductores en osteoclastos que sean comparables con este estudio.

Cuando se compara el pretratamiento con agentes reductores respecto a lo obtenido cuando se fusionan con PEG + agentes reductores desde el día cero, se observa disminución de ROS, excepto NAC y TROLOX aunque no es estadísticamente significativo. En cambio, hay una respuesta variada respecto a la tinción TRAP+, formación de anillos de actina y área resorbida. Este resultado es difícil explicarlo coherentemente a la luz del conocimiento actual. Especulando, puede ser por errores técnicos en la forma de realizar la lectura del resultado o por diferencias en el

mecanismo de acción de cada uno de los reactivos, especialmente en el pretratamiento con agentes reductores. Estos, pueden alterar o inactivar de manera diferencial las enzimas o vías que influyen en inducir mecanismos de muerte celular. Llama la atención este efecto producido por los agentes reductores porque se dejan actuar solo una hora y luego se retiran mediante lavado de las células.

Cuando se compara el pretratamiento con agentes oxidantes respecto a lo obtenido cuando se fusionan con PEG + agentes oxidantes desde el día cero, se observa disminución de ROS, tinción TRAP+, formación de anillos de actina y disminución de la resorción. Nuevamente, este resultado es difícil explicarlo coherentemente a la luz del conocimiento actual. Especulando, puesto que la fusión con PEG induce aumento de ROS intracelular, al pretratar las células con reactivos oxidantes pueden elevar los niveles de ROS, superando el nivel crítico tolerado por la célula e inducir mecanismos de muerte celular, aunque los reactivos se dejan actuar solo una hora y luego se retiran mediante lavado de las células. En cambio, al aplicarlos inmediatamente después de la fusión con PEG, aunque también producen efecto respecto a las células fusionadas con PEG sin tratamiento con reactivos, el efecto no es menor que al pretratarlas con los mismos reactivos. Probablemente, el balance oxido-reductor (niveles de ROS) es crítico para la estabilidad de la fusión (si bajan o suben demasiado, pasando el umbral crítico) y para el inicio de la actividad osteoclastogénica (154-156). Pareciera que la célula fusionada al activar los mecanismos de ROS, de alguna manera tolera mejor los agentes oxidantes y estos contribuyen a la estabilidad de la fusión o al inicio de la actividad osteoclastogénica. En cambio, disminuir estos niveles aplicando agentes reductores alteran drásticamente la actividad osteoclástica.

## **12. Conclusión**

Fusionar células U937 con PEG, induce la generación de ROS y de anillos de actina, aumenta la expresión de marcadores de diferenciación osteoclastogénicos, la actividad TRAP+ y resortiva, sugiriendo que el balance oxido-reductor (niveles de ROS) es crítico para la supervivencia, estabilidad de la fusión y para el inicio de la actividad osteoclastogénica. Dicha característica se acentúa al aplicar reactivos oxidantes y disminuye con reductores, sugiriendo que el estado oxido-reductor de la célula es determinante en la actividad osteoclastogénica.

## 13. Aportes al conocimiento

- El balance oxido-reductor (niveles de ROS) es crítico para la supervivencia, estabilidad de la fusión y para el inicio de la actividad osteoclastogénica ya que alterar el estado redox de la célula antes de la fusión induce muerte celular, mientras que aplicar reactivos pro oxidantes después de la fusión aumenta la actividad resortiva.
- Cuando la fusión se encuentra consolidada (24 h.p.f.), alterar el estado oxido-reductor de la célula no es determinante para alterar la actividad resortiva, lo que podría deberse a distintos mecanismos de regulación de ROS internos de la célula.
- Confirma lo hallado en un trabajo previo: fusionar células U937 con PEG induce 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.
- Los tratamientos reductores podrían ser una alternativa para la prevención y control en distintas patologías que implican un desequilibrio en la relación formación/resorción.
- El trabajo permite especular que la función de RANKL es la de facilitar la fusión de membranas celulares y dicha fusión es la que desencadena los eventos bioquímicos pro-oxidantes que permiten dar inicio a la actividad osteoclástica.

## 14. Perspectivas

- Dado que RANK puede autoensamblarse, inhibir RANK y realizar el mismo procedimiento para confirmar si son los eventos de fusión per se los que activan las vías osteoclastogénicas.
- Inhibir las enzimas NOX, para evaluar si el impacto en la producción de ROS producida por la fusión es dependiente de ellas.
- Aplicar los reactivos en las etapas aquí reportadas y observar la expresión de enzimas antioxidantes y pro oxidantes para analizar si la activación de estas, media la regulación de los niveles de ROS en células activas que realizan resorción.
- Analizar la resorción fijando las células en los días 1, 2 y 3 del cultivo para evaluar el momento en el cual las células comienzan este proceso y relacionarlo con la importancia de ROS en las distintas etapas.
- Realizar la metodología de este trabajo con otras líneas celulares o cultivos celulares (monocitos derivados de medula ósea o de sangre periférica), para corroborar el papel de ROS en la fusión y actividad resorptiva de osteoclastos.

## 15. Bibliografía

1. Murillo A, Guerrero C, Acosta O, Cardozo C. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol Res.* 2010;43(2):205-224.
2. Manrique E, Castillo L, Lazala O, Guerrero C, Acosta O. Bone resorptive activity of human peripheral blood mononuclear cells after fusion with polyethylene glycol. *J Bone Miner Metab.* 2017;35(2):127-141.
3. Castillo L, Guerrero C, Acosta O. Expression of typical osteoclast markers by PBMCs after PEG-induced fusion as a model for studying osteoclast differentiation. *J Mol Histol.* 2017 Jun;48(3):169-185.
4. Bax B, Alam A, Banerji B, Bax C, Bevis P, Stevens C, et al. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 183(3):1153-1158.
5. Huh Y, Kim J, Kim H, Song H, So H, Lee S, et al. Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. *Cell Death Differ.* 2006;13(7):1138-1146.
6. Jia P, Xu Y, Zhang Z, Li K, Li B, Zhang W, et al. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res.* 2012;30(11):1843-1852.
7. Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009;15(10):468-477.
8. Callaway D, Jiang J. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *J Bone Miner Metab.* 2015;33(4):359-370.

9. Ke K, Sul O, Choi E, Safdar A, Kim E, Choi H. Reactive oxygen species induce the association of SHP-1 with c-Src and the oxidation of both to enhance osteoclast survival. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(1):E61-E70.
10. Ha H, Kwak H, Lee S, Jin H, Kim H, Kim H, et al. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res.* 2004;301(2):119-127.
11. Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, Kodama T. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling. *J Biol Chem.* 2013;288(32):23009-23020.
12. Lean J, Jagger C, Kirstein B, Fuller K, Chambers T. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology.* 2005;146(2):728-735.
13. Koh J, Lee Y, Kim Y, Kim D, Kim H, Park J, et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J Bone Miner Res.* 2006 Jul;21(7):1003-1011.
14. Fitzgerald H. *Orthopaedics.* 1st ed. Hannon R, editor. St.louis Missouri: Moby,Inc; 2002.
15. Castelo C, Haya J. *Osteoporosis y Menopausia.* 2nd ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2008
16. Väänänen H, Zhao H, Mulari M, Halleen J. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000;113(3):377-381.
17. Solari F, Flamant F, Cherel Y, Wyers M, Jurdic P. The osteoclast generation: an in vitro and in vivo study with a genetically labelled avian monocytic cell line. *J Cell Sci.* 1996;109(6):1203-1213.
18. Kim J, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J.* 2016;52(1):12-17.
19. Dai X, Ryan G, Hapel A, Dominguez M, Russell R, Kapp S. Et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis,

mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. 2002;99(1):111-120.

20. Teitelbaum S. Osteoclasts: ¿What Do They Do and How Do They do it?. *Am J Pathol*. 2007;170(2):427–435.

21. Boyce B. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*. 2013;92(10):860-867.

22. Kanazawa K., Kudo A. Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently. *J Bone Miner Res*. 2005;20(11):2053-2060.

23. Armstrong A, Tometsko M, Glaccum M, Sutherland C, Cosman D, Dougall W. A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem*. 2002;277(46):44347-44356.

24. Yang G, Zaidi M, Zhang W, Zhu L, Li J, Iqbal J, et al. Functional grouping of osteoclast genes revealed through microarray analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;366(2):352-359.

25. Kang J, Lim H, Jeong J, Yim M. Attenuation of RANKL-induced Osteoclast Formation via p38-mediated NFATc1 Signaling Pathways by Extract of *Euphorbia Lathyris* L. *Journal of Bone Metabolism*. 2016;23(4):207-214.

26. An E, Narayanan M, Manes N, Nita-Lazar A. Characterization of Functional Reprogramming during Osteoclast Development Using Quantitative Proteomics and mRNA Profiling. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(10):2687-2704.

27. Sabokbar A, Mahoney D, Hemingway F, Athanasou N. Non-Canonical (RANKL-Independent) Pathways of Osteoclast Differentiation and Their Role in Musculoskeletal Diseases. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;51(1):16-26.

28. Søe K, Hobolt-Pedersen A, Delaissé J. The elementary fusion modalities of osteoclasts. *Bone*. 2015;73:181-189.

29. Hobolt-Pedersen A, Delaissé J, Søe K. Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. *Calcif Tissue Int*. 2014;95(1):73-82.

30. Levaot N, Ottolenghi A, Mann M, Guterman-Ram G, Kam Z, Geiger B. Osteoclast fusion is initiated by a small subset of RANKL-stimulated monocyte progenitors, which can fuse to RANKL-unstimulated progenitors. *Bone*. 2015;79:21-28.
31. Chiu Y, Mensah K, Schwarz E, Ju Y, Takahata M, Feng C, et al. Regulation of Human Osteoclast Development by Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP). *J Bone Miner Res*. 2012;27(1):79-92.
32. 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):345-351.
33. Mensah KA, Ritchlin CT, Schwarz EM. RANKL induces heterogeneous DC-STAMP<sup>lo</sup> and DC-STAMP<sup>hi</sup> osteoclast precursors of which the DC-STAMP<sup>lo</sup> precursors are the master fusogens. *J Cell Physiol*. 2010;223(1):76-83.
34. Maruyama K, Uematsu S, Kondo T, Takeuchi O, Martino M, Kawasaki T, et al. Strawberry notch homologue 2 regulates osteoclast fusion by enhancing the expression of DC-STAMP. *J Exp Med*. 2013;210(10):1947-1960.
35. Lundberg P, Koskinen C, Baldock P, Löthgren H, Stenberg A, Lerner U, et al. Osteoclast formation is strongly reduced both *in vivo* and *in vitro* in the absence of CD47/SIRP $\alpha$ -interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352(2):444-448.
36. Koskinen C, Persson E, Baldock P, Stenberg Å, Boström I, Matozaki T, et al. Lack of CD47 Impairs Bone Cell Differentiation and Results in an Osteopenic Phenotype *in Vivo* due to Impaired Signal Regulatory Protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) Signaling. *J Biol Chem*. 2013 Oct 11;288(41):29333-29344.
37. Møller AM, Delaissé JM, Sørensen 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.
38. Bastida-Ruiz D, Van Hoesen K, Cohen M. The Dark Side of Cell Fusion. Kemény L, ed. *Int J Mol Sci*. 2016;17(5):638.

39. Søe K, Andersen T, Hobolt-Pedersen A, Bjerregaard B, Larsson L, Delaissé J. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion, *Bone*. 2011;48(4):837-846.
40. McNally A, Anderson J. Beta1 and beta2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation. *Am J Pathol*. 2002;160(2):621-630.
41. Xing L, Xiu Y, Boyce B. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop*. 2012; 3(12):212–222.
42. Verrier S, Hogan A, McKie N, Horton M. ADAM gene expression and regulation during human osteoclast formation. *Bone*. 2004;35(1):34-46.
43. Van den Bossche J, Malissen B, Mantovani A, De Baetselier P, Van Ginderachter J. Regulation and function of the E-cadherin/catenin complex in cells of the monocyte-macrophage lineage and DCs. *Blood*. 2012;119(7):1623-1633.
44. Nicolin V, Narducci P. Expression of E-Cadherin during osteoclast formation: A Morphological Study. *Journal of Histotechnology* 2013; 31(2), 51-55
45. Thévenin A, Kowal T, Fong J, Kells R, Fisher C, Falk M. Proteins and Mechanisms Regulating Gap-Junction Assembly, Internalization, and Degradation. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(2):93-116.
46. Schilling A, Filke S, Lange T, Gebauer M, Brink S, Baranowsky A, et al. Gap junctional communication in human osteoclasts in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6A):2497-504.
47. Ilvesaro J, Väänänen K, Tuukkanen J. Bone-resorbing osteoclasts contain gap-junctional connexin-43. *J Bone Miner Res*. 2000 May;15(5):919-926.
48. Nakamura I, Duong L, Rodan S, Rodan G. Involvement of alpha(v)beta3 integrins in osteoclast function. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(6):337-344.
49. Qin A, Cheng T, Pavlos N, Lin Z, Dai K, Zheng M. V-ATPases in osteoclasts: structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(9):1422-1435.

50. Zenger S, Hollberg K, Ljusberg J, Norgård M, Ek-Rylander B, Kiviranta R, et al. Proteolytic processing and polarized secretion of tartrate-resistant acid phosphatase is altered in a subpopulation of metaphyseal osteoclasts in cathepsin K-deficient mice. *Bone*. 2007;41(5):820-832.
51. Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, et al. Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sci*. 2007;80(14):1311-1318.
52. Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer R, Hall M, Lindsey M. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.
53. Christensen J, Shastri V. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by Cathepsin K. *BMC Res Notes*. 2015;8:322.
54. Hayman A. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41(3):218-223.
55. Räisänen S, Alatalo S, Ylipahkala H, Halleen J, Cassady A, Hume D, et al. Macrophages overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase show altered profile of free radical production and enhanced capacity of bacterial killing. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(1):120–126.
56. Halleen J, Räisänen S, Salo J, Reddy S, Roodman G, Hentunen T, et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrateresistant acid phosphatase. *J Biol Chem*. 1999;274(33):22907-22910.
57. Koppenol W. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med*. 1993;15(6):645-651.
58. Singh N, Haldar S, Tripathi A, Horback K, Wong J, Sharma D, et al. Brain iron homeostasis: from molecular mechanisms to clinical significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(8):1324-1363.

59. Kotake S, Yago T, Kawamoto M, Nanke Y. Voltage-dependent anion channels (VDACs, porin) expressed in the plasma membrane regulate the differentiation and function of human osteoclasts. *Cell Biol Int*. 2013;37(1):65-77.
60. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int*. 2008;28(4):317-321.
61. Polat B, Halici Z, Cadirci E, Albayrak A, Karakus E, Bayir Y, et al. The effect of alpha-lipoic acid in ovariectomy and inflammation-mediated osteoporosis on the skeletal status of rat bone. *Eur J Pharmacol*. 2013;718(1-3):469-474.
62. Lim J, Huang B, Deen W, Sikes H. Analysis of the lifetime and spatial localization of hydrogen peroxide generated in the cytosol using a reduced kinetic model. *Free Radic Biol Med*. 2015; 89:47-53.
63. Birben E, Sahiner U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.
64. Cai H, Li Z, Davis M, Kanner W, Harrison D, Dudley S. Akt-dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol*. 2003;63(2):325-331.
65. Griendling K, Sorescu D, Lassegue B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(10):2175–2183.
66. Lee C, Miura K, Liu X, Zweier J. Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2000;275(50):38965–38972.
67. Hyeon S, Lee H, Yang Y, Jeong W. Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation. *Free Radic Biol Med*. 2013 ;65:789-799.
68. Srinivasan S, Avadhani N. Hypoxia-mediated mitochondrial stress in RAW264.7 cells induces osteoclast-like TRAP-positive cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1117:51-61.

69. Kim H, Lee Y, Kim H, Lee Z, Kim H. SOD2 and Sirt3 Control Osteoclastogenesis by Regulating Mitochondrial ROS. *J Bone Miner Res.* 2017;32(2):397-406.
70. Guo T, Zhang L, Konermann A, Zhou H, Jin F, Liu W. Manganese superoxide dismutase is required to maintain osteoclast differentiation and function under static force. *Sci Rep.* 2015;5:8016.
71. Moon HJ, Ko WK, Han SW, Kim DS, Hwang YS, Park HK, et al. Antioxidants, like coenzyme Q10, selenite, and curcumin, inhibited osteoclast differentiation by suppressing reactive oxygen species generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418(2):247-253.
73. Li D, Zhang Q, Dong X, Li H, 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 Sep;32(5):494-504.
74. Quinn M, Schepetkin I. Role of NADPH oxidase in formation and function of multinucleated giant cells. *J Innate Immun.* 2009;1(6):509-526.
75. Yang S, Ries W, Key. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63:346–350.
76. Darden A, Ries W, Wolf W, Rodriguiz R, Key L. Osteoclastic superoxide production and bone resorption: stimulation and inhibition by modulators of NADPH oxidase. *J Bone Miner Res.* 1996;11(5):671–675.
77. Yang S, Zhang Y, Ries W, Key L. Expression of Nox4 in osteoclasts. *J Cell Biochem.* 2004; 92(2):238–248.
78. Steinbeck M, Kim J, Trudeau M, Hauschka P, Karnovsky M. Involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of clonal HD-11EM cells into osteoclast-like cells. *J Cell Physiol.* 1998; 176(3):574–587.
79. Segal B, Romani L, Puccetti P. Chronic granulomatous disease. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Feb;66(4):553-558.

- 
80. Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1289-301.
81. Mori I, Schroeder J. Reactive oxygen species activation of plant Ca<sup>2+</sup> channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction. *Plant Physiol.* 2004;135(2):702-708.
82. Ibáñez L, Ferrándiz M, Brines R, Guede D, Cuadrado A, Alcaraz M. Effects of Nrf2 deficiency on bone microarchitecture in an experimental model of osteoporosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:726590.
83. Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, Fukaya S, Miyamoto Y, Nakamura Y. Nuclear Nrf2 induction by protein transduction attenuates osteoclastogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2014;77:239-248
84. Kanzaki H, Shinohara F, Itohiya K, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Matsuzawa M, et al. RANKL induces Bach1 nuclear import and attenuates Nrf2-mediated antioxidant enzymes, thereby augmenting intracellular reactive oxygen species signaling and osteoclastogenesis in mice. *FASEB J.* 2017;31(2):781-792.
85. Zhou Z, Han J, Xi C, Xie J, Feng X, Wang C, et al. HMGB1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis in a manner dependent on RAGE. *J Bone Miner Res.* 2008;23(7):1084-1096.
86. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, et al. Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. *J Cell Biochem.* 2012;113(2):486-498.
87. Tai T, Chen C, Su F, Tu Y, Tsai T, Lin C, et al. Reactive oxygen species are required for zoledronic acid-induced apoptosis in osteoclast precursors and mature osteoclast-like cells. *Sci Rep.* 2017;7:44245.
88. Zhou J, Ye S, Fujiwara T, Manolagas S, Zhao H. Steap4 Plays a Critical Role in Osteoclastogenesis in Vitro by Regulating Cellular Iron/Reactive Oxygen Species (ROS) Levels and cAMP Response Element-binding Protein (CREB) Activation. *J Biol Chem.* 2013;288(42):30064-30074.

89. Gorrini C, Harris I, Mak T. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(12):931-947.
90. West A, Shadel G, Ghosh S. Mitochondria in innate immune responses. *Nature reviews Immunology.* 2011;11(6):389-402
91. Lean J, Jagger C, Kirstein B, Fuller K, Chambers T. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology.* 2005;146(2):728-735.
92. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005;16(10):577–586.
93. Kalinina E, Chernov N, Novichkova M. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Mosc).* 2014;79(13):1562-1583.
94. Diaz P, Wolff T, Markovic J, Pallardó F, Foyer C. A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochem J.* 2010;431(2):169-178.
95. Zafarullah M, Li W, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60(1):6-20.
96. Wu Y, Muldoon L, Neuwelt E. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(2):424-431.
97. 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.
98. Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2009;80(4):672-678.

99. Dieguez S, Soraci A, Bedascarrasbure E, Libonatti C. Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2013;47(3):159-166
100. Zwerina J, Tzima S, Hayer S, Redlich K, Hoffmann O, Hanslik-Schnabel B, et al. Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J*. 2005 Dec;19(14):2011-2013.
101. Gu D, Lee J, Oh G, Kim H, Kim M, Lee S. The inhibitory effect of beta-lapachone on RANKL-induced osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482(4):1073-1079.
102. Lee Y, Kim Y, Lee S, Kim G, Kim B, Lee S. et al. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone*. 2010;47(5):926-937
103. Kanzaki H, Shinohara F, Kanako I, Yamaguchi Y, Fukaya S, Miyamoto Y, et al. Molecular regulatory mechanisms of osteoclastogenesis through cytoprotective enzymes. *Redox Biology*. 2016;8:186-191.
104. Dodds R, Gowen M, Bradbeer J. Microcytophotometric analysis of human osteoclast metabolism: lack of activity in certain oxidative pathways indicates inability to sustain biosynthesis during resorption. *J Histochem Cytochem*. 1994;42(5):599-606.
105. Brooks R, Kalia P, Ireland D, Beeton C, Rushton N. Direct inhibition of osteoclast formation and activity by the vitamin E isomer gamma-tocotrienol. *Int J Vitam Nutr Res*. 2011;81(6):358-367.
106. Ha H, Lee J, Kim H, Lee Z.  $\alpha$ -Tocotrienol inhibits osteoclastic bone resorption by suppressing RANKL expression and signaling and bone resorbing activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406(4):546-551.
107. Johnson S, Feresin R, Soung do Y, Elam M, Arjmandi B. Vitamin E suppresses ex vivo osteoclastogenesis in ovariectomized rats. *Food Funct*. 2016;7(3):1628-1633.
108. Fujita K, Iwasaki M, Ochi H, Fukuda T, Ma C, Miyamoto T, et al. Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion. *Nat Med*. 2012;18(4):589-594.

109. Le Nihouannen D, Barralet J, Fong J, Komarova S. Ascorbic acid accelerates osteoclast formation and death. *Bone*. 2010;46(5):1336-1343.
110. Tsuneto M, Yamazaki H, Yoshino M, Yamada T, Hayashi S. Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(4):1239-1246.
111. Xiao X, Liao E, Zhou H, Dai R, Yuan L, Wu X. Ascorbic acid inhibits osteoclastogenesis of RAW264.7 cells induced by receptor activated nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in vitro. *J Endocrinol Invest*. 2005;28(3):253-260.
112. Hie M, Tsukamoto I. Vitamin C-deficiency stimulates osteoclastogenesis with an increase in RANK expression. *J Nutr Biochem*. 2011;22(2):164-171.
113. Feng J, Melcher A, Brunette D, Moe H. Determination of L-ascorbic acid levels in culture medium: concentrations in commercial media and maintenance of levels under conditions of organ culture. *In Vitro*. 1977;13(2):91-99.
114. Mastrangelo D, Massai L, Fioritoni G, Lo Coco F. Vitamin C Against Cancer. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, Amal H. Hamza (ed), 2017.
115. Rodriguez G. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1997;11(1):46-57
116. Hosakote Y, Komaravelli N, Mautemps N, Liu T, Garofalo R, Casola A. Antioxidant mimetics modulate oxidative stress and cellular signaling in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(11):L991-1000.
117. Lee J, Kim H, Yang D, Kyoung Suk J, Hyun-Man K, Hong-Hee K, et al. Trolox Prevents Osteoclastogenesis by Suppressing RANKL Expression and Signaling. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13725-13734.
118. 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.

119. Soule B, Hyodo F, Matsumoto K, Simone N, Cook J, Krishna M, et al. The Chemistry and Biology of Nitroxide Compounds. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jun 1;42(11):1632-1650.
120. Yamato M, Kawano K, Yamanaka Y, Saiga M, Yamada K. TEMPOL increases NAD<sup>+</sup> and improves redox imbalance in obese mice. *Redox Biology.* 2016;8:316-322.
121. Dhas M, Jawahar A, Benial A. Electron Spin Resonance Spectroscopy Studies on Reduction Process of Nitroxyl Radicals used in Molecular Imaging. *European Journal of Biophysics.* 2014;2(1): 1-6
122. Samuni Y, Gamson J, Samuni A, Yamada K, Russo A, Krishna M, et al. Factors influencing nitroxide reduction and cytotoxicity in vitro. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6(3):587-95.
123. Golladay S, Park S, Aust A. Efflux of reduced glutathione after exposure of human lung epithelial cells to crocidolite asbestos. *Environmental Health Perspectives.* 1997;105(5):1273-1277.
124. Darfler F. 1998 Cell culture medium with antioxidant. US4927762 A. USA – Virginia. Cell Enterprises, Inc. Patente.
125. Wang C, Chu C, Chu K, Choy K, Khaw K, Rogers M. et al. Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clin Chem.* 2004;50(5):952-954.
126. Baek K, Oh K, Lee W, Lee S, Kim M, Kwon H, et al. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif Tissue Int.* 2010;87(3):226-235.
127. Song Y, Driessens N, Costa M, De Deken X, Detours V, Corvilain B, et al. Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):3764-3773.
128. Albu E, Filip C, Zamosteanu N, Jaba I, Linic I, Sosa I. Hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Med Hypotheses.* 2012;78(4):554-555.

129. Austin R, Lentz S, Werstuck G. Role of hyperhomocysteinemia in endothelial dysfunction and atherothrombotic disease. *Cell Death Differ.* 2004;11 Suppl 1:S56-64.
130. Tyagi N, Sedoris K, Steed M, Ovechkin A, Moshal K, Tyagi S. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(6):H2649-2656.
131. Albu E, Filip C, Zamosteanu N. Homocysteine in Red Blood Cells Metabolism - Pharmacological Approaches, *Blood Cell - An Overview of Studies in Hematology*. Dr. Terry Moschandreu (Ed.), InTech. 2012.
132. Hernanz A, Fernández E, Montiel C, Vazquez J, Arnalich F. Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci.* 2000;67(11):1317-1324.
133. Guttormsen A, Mansoor A, Fiskerstrand T, Ueland P, Refsum H. Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading. *Clin Chem.* 1993;39(7):1390-1937.
134. 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.
135. Chacko B, Zhi D, Darley-Usmar V, Mitchell T. The Bioenergetic Health Index is a sensitive measure of oxidative stress in human monocytes. *Redox Biology.* 2016;8:43-50.
136. 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 Sep 26;83(13-14):460-467.
137. Liu R, Shi M, Giulivi C, Forman H. Quinones increase gamma-glutamyl transpeptidase expression by multiple mechanisms in rat lung epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274(3 Pt 1): L330-L336.
138. Sharma R, Callaway D, Vanegas D, Bendele M, Lopez-Cruzan M, Horn D, et al. Caspase-2 maintains bone homeostasis by inducing apoptosis of oxidatively-damaged osteoclasts. *PLoS One.* 2014;9(4):e93696.

139. Lentz B, Lee J. Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release?. *Mol Membr Biol.* 1999;16(4):279-296.
140. Chernomordik L, Kozlov M. Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell.* 2005;123(3):375-382.
141. Chernomordik LV, Kozlov MM. Mechanics of membrane fusion. *Nature structural & molecular biology.* 2008;15(7):675-683.
142. Daudey G, Zope H, Voskuhl J, Kros A, Boyle A. Membrane-Fusogen Distance Is Critical for Efficient Coiled-Coil-Peptide-Mediated Liposome Fusion. *Langmuir.* 2017;33(43):12443-12452.
143. Yang J, Shen M. Polyethylene glycol-mediated cell fusion. *Methods Mol Biol.* 2006;325: 59-66.
144. Kim M, Kim H, Lee S, Gu D, Lee S, Lee K, et al. ADP-Ribosylation Factor 1 Regulates Proliferation, Migration, and Fusion in Early Stage of Osteoclast Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):29305-29314.
145. Goettsch C, Babelova A, Trummer O, Erben R, Rauner M, Rammelt S, et al. NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4731-8.
146. Abeydeera L, Wang W, Cantley T, Prather R, Day B. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology.* 1998;50(5):747-756.
147. Whitaker B, Knight J. Exogenous gamma-glutamyl cycle compounds supplemented to in vitro maturation medium influence in vitro fertilization, culture, and viability parameters of porcine oocytes and embryos. *Theriogenology.* 2004;62(1-2):311-322.
148. McCloy R, Rogers S, Caldon C, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle.* 2014;13(9):1400-1412.

149. Burgess A, Vigneron S, Brioude E, Labbé J, Lorca T, Castro A. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(28):12564-12569.
150. Vesprey A, Yang W. Pit Assay to Measure the Bone Resorptive Activity of Bone Marrow-derived Osteoclasts. *Bio Protoc*. 2016;6(12). pii: e1836.
151. Alblas J, Honing H, de Lavalette C, Brown M, Dijkstra C, van den Berg T. Signal regulatory protein alpha ligation induces macrophage nitric oxide production through JAK/STAT- and phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1/NAPDH oxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent pathways. *Mol Cell Biol*. 2005;25(16):7181-92.
152. Edgar P. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: Outsourcing a key task. *Small GTPases*. 2014; 5: e27952.
153. Ryder L, Dagdas Y, Mentlak T, Kershaw M, Thornton C, Schuster M, et al. NADPH oxidases regulate septin-mediated cytoskeletal remodeling during plant infection by the rice blast fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(8):3179-3184.
154. Moldovan L, Irani K, Moldovan N, Finkel T, Goldschmidt-Clermont P. The actin cytoskeleton reorganization induced by Rac1 requires the production of superoxide. *Antioxid Redox Signal*. 1999 Spring;1(1):29-43.
155. Park S, Kim Y, Jeon Y. Antioxidant dieckol downregulates the Rac1/ROS signaling pathway and inhibits Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-family verprolin-homologous protein 2 (WAVE2)-mediated invasive migration of B16 mouse melanoma cells. *Mol Cells*. 2012;33(4):363-369.
156. Kim Y, Kim J, Lee E, Park S, Han S, Kang S, et al. Fisetin antagonizes cell fusion, cytoskeletal organization and bone resorption in RANKL-differentiated murine macrophages. *J Nutr Biochem*. 2014;25(3):295-303.
157. Dai S, Abu-Amer W, Karuppaiah K, Abu-Amer Y. Evidence that the kinase-truncated c-Src regulates NF- $\kappa$ B signaling by targeting NEMO. *J Cell Biochem*. 2011;112(9):2463-2470.

158. Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem.* 2003;278(8):5557-5563.
159. Srinivasan S, Koenigstein A, Joseph J, Sun L, Kalyanaraman B, Zaidi M, et al. Role of mitochondrial reactive oxygen species in osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:245-252.
160. Lyublinskaya O, Ivanova J, Pugovkina N, Kozhukharova I, Kovaleva Z, Shatrova A, et al. Redox environment in stem and differentiated cells: A quantitative approach. *Redox Biol.* 2017;12:758-769.
161. Vurusaner B, Gamba P, Gargiulo S, Testa G, Staurenghi E, Leonarduzzi G, et al. Nrf2 antioxidant defense is involved in survival signaling elicited by 27-hydroxycholesterol in human promonocytic cells. *Free Radic Biol Med.* 2016;91:93-104.
162. Al-Saryi N, Al-Hejjaj M, van Roermund C, Hulmes G, Ekal L, Payton C, et al. Two NAD-linked redox shuttles maintain the peroxisomal redox balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep.* 2017 Sep 19;7(1):11868.
163. Sart S, Song L, Li Y. Controlling Redox Status for Stem Cell Survival, Expansion, and Differentiation. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:105135.

## 16. ANEXOS

### 1.1 Tablas de Resultados.

**Tabla 1. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la producción de especies reactivas de oxígeno.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	356%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + DMNQ	45%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	52%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	10%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	14%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	49%	** P ≤ 0.01
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ1	5%	ns
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ2	24%	ns
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ3	21%	ns
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ2	28%	ns
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ3	25%	ns
PEG + DMNQ2 vs PEG + DMNQ3	4%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY	113%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + HCY1	121%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + HCY2	6%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	24%	ns
PEG Solo vs PEG + HCYPT	20%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY1	4%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY2	50%	** P ≤ 0.01
PEG + HCY vs PEG + HCY3	64%	**** P ≤ 0.0001
PEG + HCY1 vs PEG + HCY2	52%	**** P ≤ 0.0001
PEG + HCY1 vs PEG + HCY3	66%	**** P ≤ 0.0001
PEG + HCY2 vs PEG + HCY3	28%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	86%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	25%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	29%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	24%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	38%	* P ≤ 0.05
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	33%	* P ≤ 0.05
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	31%	* P ≤ 0.05
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	73%	**** P ≤ 0.0001
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	3%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	60%	** P ≤ 0.01
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	61%	** P ≤ 0.01

PEG Solo vs PEG +AA		1%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A1		0%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A2		10%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A3		45%	ns
PEG Solo vs PEG + A.APT		80%	**** P ≤ 0.0001
PEG + A.A vs PEG + A.A1		1%	ns
PEG + A.A vs PEG + A.A2		10%	ns
PEG + A.A vs PEG + A.A3		44%	ns
PEG + A.A1 vs PEG + A.A2		10%	ns
PEG + A.A1 vs PEG + A.A3		38%	ns
PEG + A.A2 vs PEG + A.A3		38%	ns
PEG Solo vs PEG +TROLOX		70%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + TROLOX1		61%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX2		13%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX3		48%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT		60%	*** P ≤ 0.001
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX1		32%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX2		191%	*** P ≤ 0.001
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX3		74%	ns
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX2		121%	** P ≤ 0.01
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX3		31%	ns
PEG + TROLOX2 vs PEG + TROLOX3		40%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + GSH+BME		29%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME1		34%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2		8%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3		21%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT		57%	*** P ≤ 0.001
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME1		6%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME2		53%	** P ≤ 0.01
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME3		11%	** P ≤ 0.01
PEG + GSH+BME1 vs PEG + GSH+BME2		62%	ns
PEG + GSH+BME1 vs PEG + GSH+BME3		19%	ns
PEG + GSH+BME2 vs PEG + GSH+BME3		27%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC		67%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + NAC1		69%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + NAC2		69%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC3		34%	ns
PEG Solo vs PEG + NACPT		19%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC1		7%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC2		15%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC3		104%	ns
PEG + NAC1 vs PEG + NAC2		8%	ns
PEG + NAC1 vs PEG + NAC3		112%	ns
PEG + NAC2 vs PEG + NAC3		130%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL		68%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1		42%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2		7%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3		21%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT		77%	*** P ≤ 0.001
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL1		108%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL2		236%	*** P ≤ 0.001
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL3		186%	* P ≤ 0.05
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL2		62%	ns
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL3		38%	ns
PEG + TEMPOL2 vs PEG + TEMPOL3		15%	ns

**Tabla 2. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la generación de células multinucleadas TRAP positivas.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	91%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + DMNQ	73%	*** P ≤ 0.001
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	45%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	31%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	27%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	5%	ns
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ1	16%	* P ≤ 0.05
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ2	26%	*** P ≤ 0.001
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ3	26%	*** P ≤ 0.001
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ2	11%	ns
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ3	12%	ns
PEG + DMNQ2 vs PEG + DMNQ3	1%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY	49%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY1	41%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY2	28%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	26%	ns
PEG Solo vs PEG + HCYPT	6%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY1	6%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY2	12%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY3	16%	ns
PEG + HCY1 vs PEG + HCY2	11%	ns
PEG + HCY1 vs PEG + HCY3	15%	ns
PEG + HCY2 vs PEG + HCY3	4%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	47%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	38%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	18%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	29%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	2%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	6%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	20%	* P ≤ 0.05
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	12%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	15%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	7%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	4%	ns
PEG Solo vs PEG + AA	16%	ns
PEG Solo vs PEG + AA1	43%	ns
PEG Solo vs PEG + AA2	7%	ns
PEG Solo vs PEG + AA3	35%	ns
PEG Solo vs PEG + AA.PT	40%	ns
PEG + AA vs PEG + AA1	23%	ns
PEG + AA vs PEG + AA2	7%	ns
PEG + AA vs PEG + AA3	17%	ns
PEG + AA1 vs PEG + AA2	25%	* P ≤ 0.05
PEG + AA1 vs PEG + AA3	5%	ns
PEG + AA2 vs PEG + AA3	26%	ns

PEG Solo vs PEG +TROLOX		11%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX1		0%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX2		14%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX3		13%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT		10%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX1		12%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX2		3%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX3		2%	ns
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX2		14%	ns
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX3		12%	ns
PEG + TROLOX2 vs PEG + TROLOX3		2%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME		20%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME1		27%	*** P ≤ 0.001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2		20%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3		16%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT		24%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME1		9%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME2		0%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME3		5%	ns
PEG + GSH+BME1 vs PEG + GSH+BME2		10%	ns
PEG + GSH+BME1 vs PEG +		16%	ns
PEG + GSH+BME2 vs PEG +		6%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC		24%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC1		27%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC2		14%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC3		1%	ns
PEG Solo vs PEG + NACPT		25%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC1		23%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC2		13%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC3		30%	ns
PEG + NAC1 vs PEG + NAC2		8%	ns
PEG + NAC1 vs PEG + NAC3		6%	ns
PEG + NAC2 vs PEG + NAC3		15%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL		35%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1		15%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2		1%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3		6%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT		21%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL1		31%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL2		52%	** P ≤ 0.01
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL3		64%	*** P ≤ 0.001
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL2		16%	ns
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL3		25%	ns
PEG + TEMPOL2 vs PEG + TEMPOL3		7%	ns

**Tabla 3. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la cantidad de osteoclastos que generan anillos de actina.**

Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	904%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + DMNQ	7%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	14%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	8%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	2%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	60%	** P ≤ 0.01
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ1	7%	ns
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ2	24%	ns
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ3	21%	ns
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ2	7%	ns
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ3	18%	ns
PEG + DMNQ2 vs PEG + DMNQ3	11%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY	7%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY1	5%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY2	18%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	17%	ns
PEG Solo vs PEG + HCYPT	62%	** P ≤ 0.01
PEG + HCY vs PEG + HCY1	2%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY2	24%	ns
PEG + HCY vs PEG + HCY3	9%	ns
PEG + HCY1 vs PEG + HCY2	22%	ns
PEG + HCY1 vs PEG + HCY3	11%	ns
PEG + HCY2 vs PEG + HCY3	43%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	19%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	2%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	4%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	2%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	50%	** P ≤ 0.01
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	18%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	13%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	14%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	6%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	5%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	43%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A	51%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + A.A1	36%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A2	18%	ns
PEG Solo vs PEG + A.A3	2%	ns
PEG Solo vs PEG + A.APT	46%	ns
PEG + A.A vs PEG + A.A1	31%	ns
PEG + A.A vs PEG + A.A2	68%	ns
PEG + A.A vs PEG + A.A3	102%	** P ≤ 0.01

PEG + A.A1 vs PEG + A.A2	↑	28%	ns
PEG + A.A1 vs PEG + A.A3	↑	54%	ns
PEG + A.A2 vs PEG + A.A3	↑	20%	ns
PEG Solo vs PEG +TROLOX	↓	57%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX1	↓	51%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX2	↓	4%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOX3	↓	2%	ns
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT	↓	75%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX1	↓	14%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX2	↑	67%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX3	↑	61%	ns
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX2	↑	94%	ns
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX3	↑	87%	ns
PEG + TROLOX2 vs PEG + TROLOX3	↓	4%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME	↓	76%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME1	↓	70%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2	↓	30%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3	↓	21%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT	↓	71%	** P ≤ 0.01
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME1	↑	23%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME2	↑	192%	** P ≤ 0.01
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME3	↑	230%	*** P ≤ 0.001
PEG + GSH+BME1 vs PEG + GSH+BME2	↑	138%	** P ≤ 0.01
PEG + GSH+BME1 vs PEG +	↑	169%	*** P ≤ 0.001
PEG + GSH+BME2 vs PEG +	↑	13%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC	↓	61%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC1	↓	43%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC2	↓	23%	ns
PEG Solo vs PEG + NAC3	↓	5%	ns
PEG Solo vs PEG + NACPT	↓	63%	** P ≤ 0.01
PEG + NAC vs PEG + NAC1	↑	44%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC2	↑	94%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC3	↑	141%	* P ≤ 0.05
PEG + NAC1 vs PEG + NAC2	↑	35%	ns
PEG + NAC1 vs PEG + NAC3	↑	68%	ns
PEG + NAC2 vs PEG + NAC3	↑	25%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL	↓	89%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1	↓	48%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2	↓	18%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3	↑	3%	ns
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT	↓	56%	** P ≤ 0.01
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL1	↑	376%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL2	↑	646%	* P ≤ 0.05
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL3	↑	770%	*** P ≤ 0.001
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL2	↑	57%	ns
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL3	↑	98%	* P ≤ 0.05
PEG + TEMPOL2 vs PEG + TEMPOL3	↑	26%	ns

**Tabla 4. Tratamientos correspondientes a la aplicación de agentes oxidantes o reductores con respecto a su efecto en la resorción ósea.**

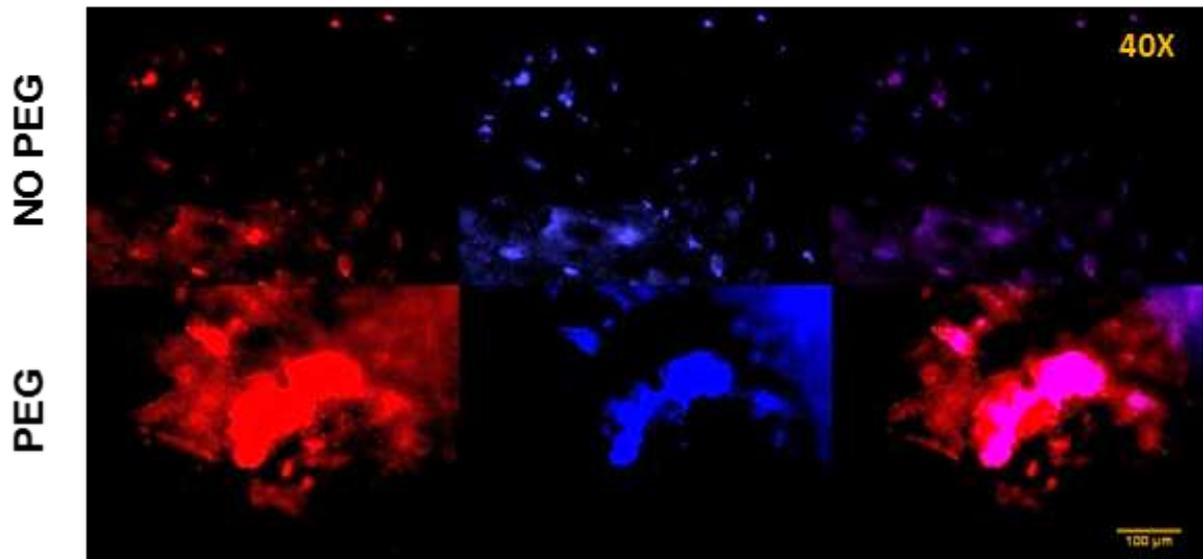
Tratamientos	Diferencias en porcentaje (%)	Valor P
NO PEG vs PEG solo	1771%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + DMNQ	73%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + DMNQ1	45%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ2	21%	ns
PEG Solo vs PEG + DMNQ3	30%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + DMNQPT	79%	**** P ≤ 0.0001
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ1	16%	** P ≤ 0.01
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ2	17%	** P ≤ 0.01
PEG + DMNQ vs PEG + DMNQ3	52%	**** P ≤ 0.0001
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ2	1%	**** P ≤ 0.0001
PEG + DMNQ1 vs PEG + DMNQ3	43%	**** P ≤ 0.0001
PEG + DMNQ2 vs PEG + DMNQ3	42%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + HCY	40%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + HCY1	16%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY2	15%	ns
PEG Solo vs PEG + HCY3	5%	ns
PEG Solo vs PEG + HCYPT	70%	**** P ≤ 0.0001
PEG + HCY vs PEG + HCY1	18%	*** P ≤ 0.001
PEG + HCY vs PEG + HCY2	18%	*** P ≤ 0.001
PEG + HCY vs PEG + HCY3	32%	*** P ≤ 0.001
PEG + HCY1 vs PEG + HCY2	1%	ns
PEG + HCY1 vs PEG + HCY3	18%	ns
PEG + HCY2 vs PEG + HCY3	17%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	15%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	10%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	16%	ns
PEG Solo vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> PT	67%	** P ≤ 0.01
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1	16%	**** P ≤ 0.0001
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	34%	**** P ≤ 0.0001
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	6%	**** P ≤ 0.0001
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2	22%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	27%	ns
PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2 vs PEG + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3	6%	ns
PEG Solo vs PEG + AA	64%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + AA1	67%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + AA2	56%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + AA3	22%	* P ≤ 0.05
PEG Solo vs PEG + A.APT	48%	**** P ≤ 0.0001
PEG + AA vs PEG + AA1	7%	ns
PEG + AA vs PEG + AA2	23%	ns
PEG + AA vs PEG + AA3	119%	**** P ≤ 0.0001
PEG + AA1 vs PEG + AA2	33%	ns
PEG + AA1 vs PEG + AA3	136%	**** P ≤ 0.0001
PEG + AA2 vs PEG + AA3	78%	**** P ≤ 0.0001

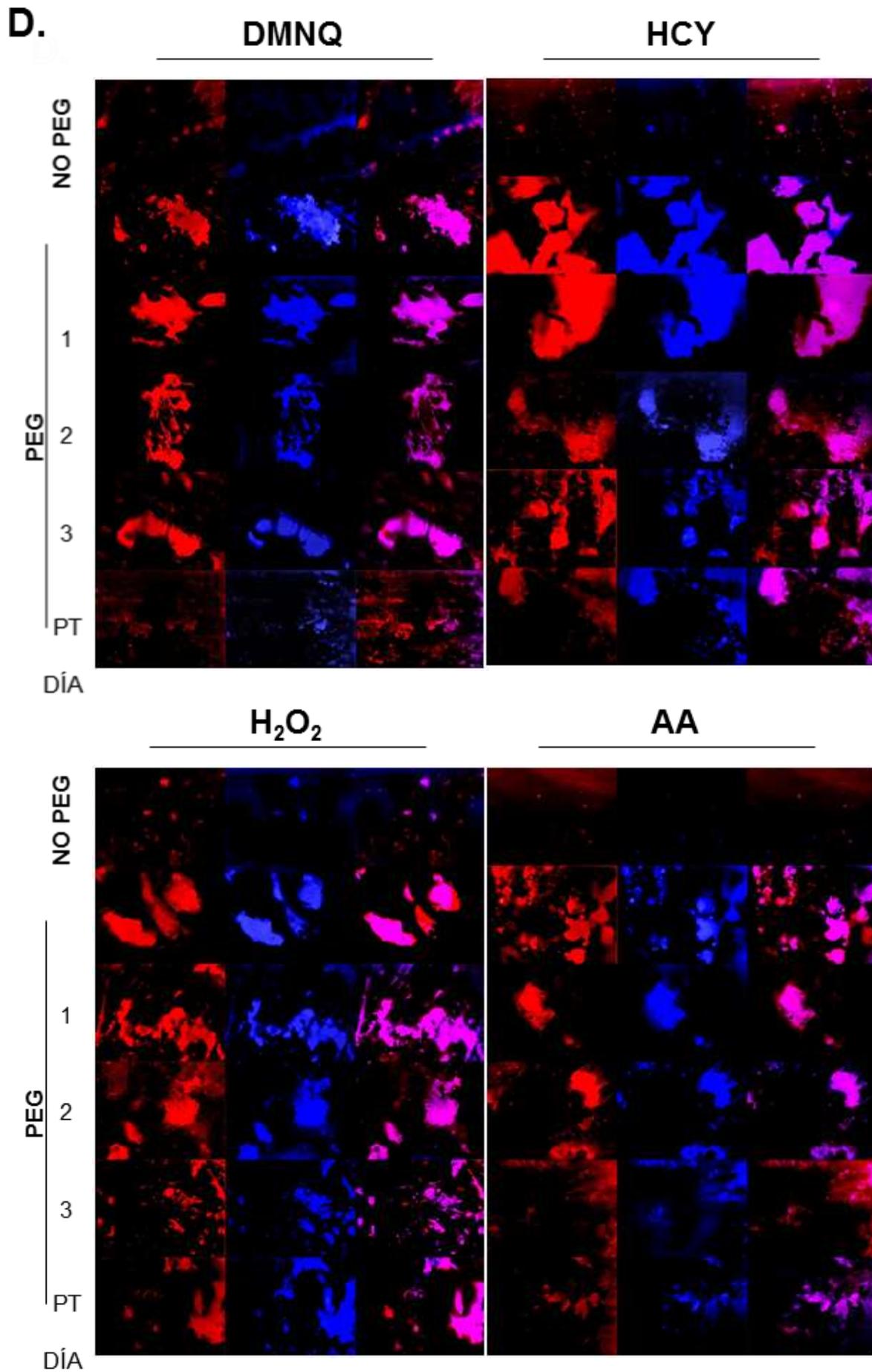
PEG Solo vs PEG +TROLOX	↓	72%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOX1	↓	72%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOX2	↓	77%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TROLOX3	↓	40%	*** P ≤ 0.001
PEG Solo vs PEG + TROLOXPT	↓	59%	**** P ≤ 0.0001
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX1	↓	1%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX2	↓	17%	ns
PEG + TROLOX vs PEG + TROLOX3	↑	112%	**** P ≤ 0.0001
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX2	↓	16%	ns
PEG + TROLOX1 vs PEG + TROLOX3	↑	115%	**** P ≤ 0.0001
PEG + TROLOX2 vs PEG + TROLOX3	↑	156%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME	↓	74%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME1	↓	61%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 2	↓	39%	*** P ≤ 0.001
PEG Solo vs PEG + GSH+BME 3	↓	24%	ns
PEG Solo vs PEG + GSH+BMEPT	↓	59%	**** P ≤ 0.0001
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME1	↑	50%	ns
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME2	↑	134%	**** P ≤ 0.0001
PEG + GSH+BME vs PEG + GSH+BME3	↑	189%	**** P ≤ 0.0001
PEG + GSH+BME1 vs PEG + GSH+BME2	↑	56%	** P ≤ 0.01
PEG + GSH+BME1 vs PEG + GSH+BME3	↑	93%	**** P ≤ 0.0001
PEG + GSH+BME2 vs PEG + GSH+BME3	↑	24%	** P ≤ 0.01
PEG Solo vs PEG + NAC	↓	75%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC1	↓	77%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC2	↓	79%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NAC3	↓	46%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + NACPT	↓	55%	**** P ≤ 0.0001
PEG + NAC vs PEG + NAC1	↓	9%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC2	↓	16%	ns
PEG + NAC vs PEG + NAC3	↑	112%	**** P ≤ 0.0001
PEG + NAC1 vs PEG + NAC2	↓	8%	ns
PEG + NAC1 vs PEG + NAC3	↑	131%	**** P ≤ 0.0001
PEG + NAC2 vs PEG + NAC3	↑	151%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL	↓	79%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL1	↓	75%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL2	↓	69%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOL3	↓	41%	**** P ≤ 0.0001
PEG Solo vs PEG + TEMPOLPT	↓	72%	**** P ≤ 0.0001
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL1	↑	18%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL2	↑	47%	ns
PEG + TEMPOL vs PEG + TEMPOL3	↑	184%	**** P ≤ 0.0001
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL2	↑	24%	ns
PEG + TEMPOL1 vs PEG + TEMPOL3	↑	140%	**** P ≤ 0.0001
PEG + TEMPOL2 vs PEG + TEMPOL3	↑	93%	**** P ≤ 0.0001

## 1.2 Fotografías de los Resultados.

Fig. 1 ROS

**B.**





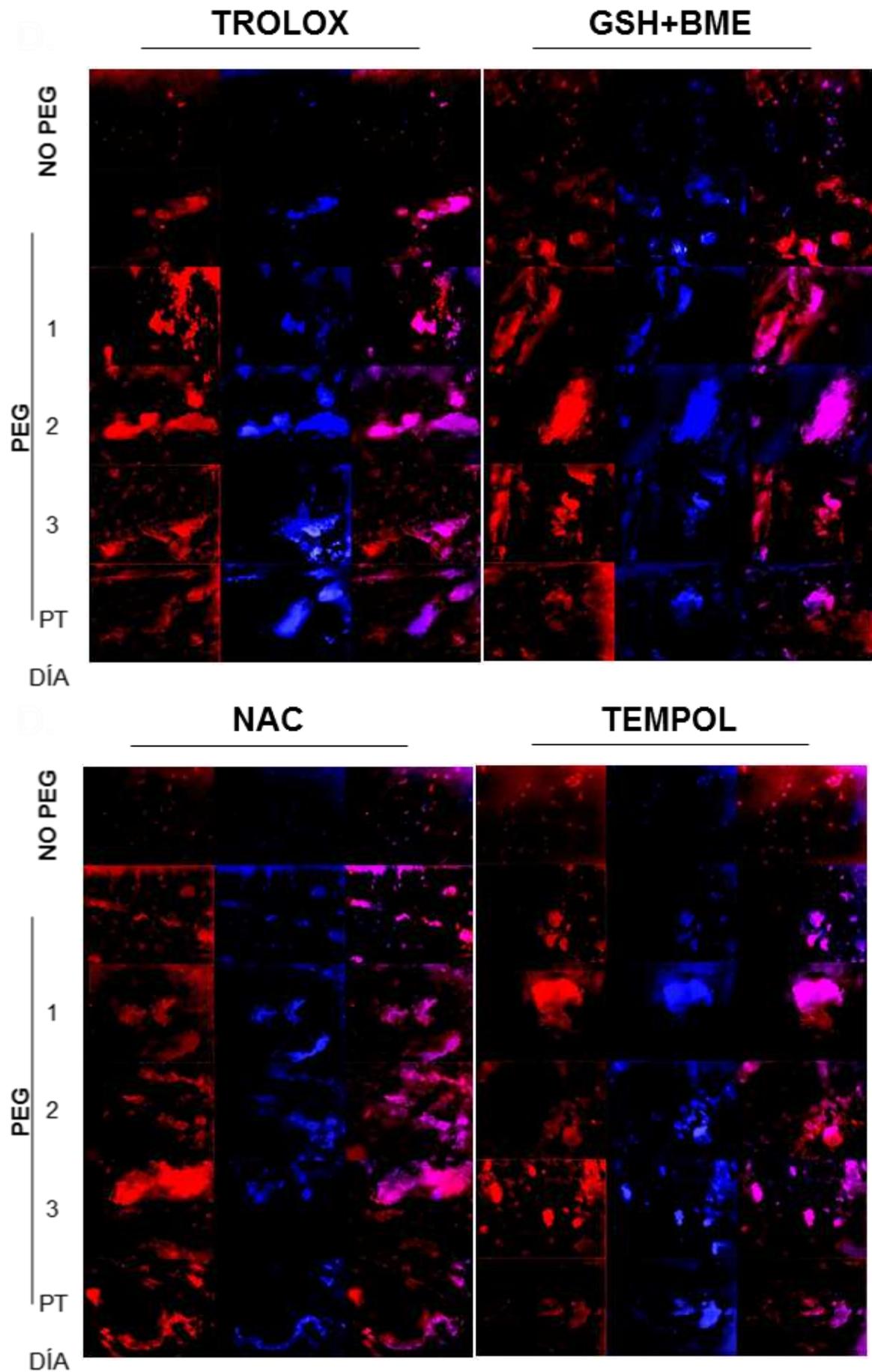


Fig. 2 TINCIÓN TRAP

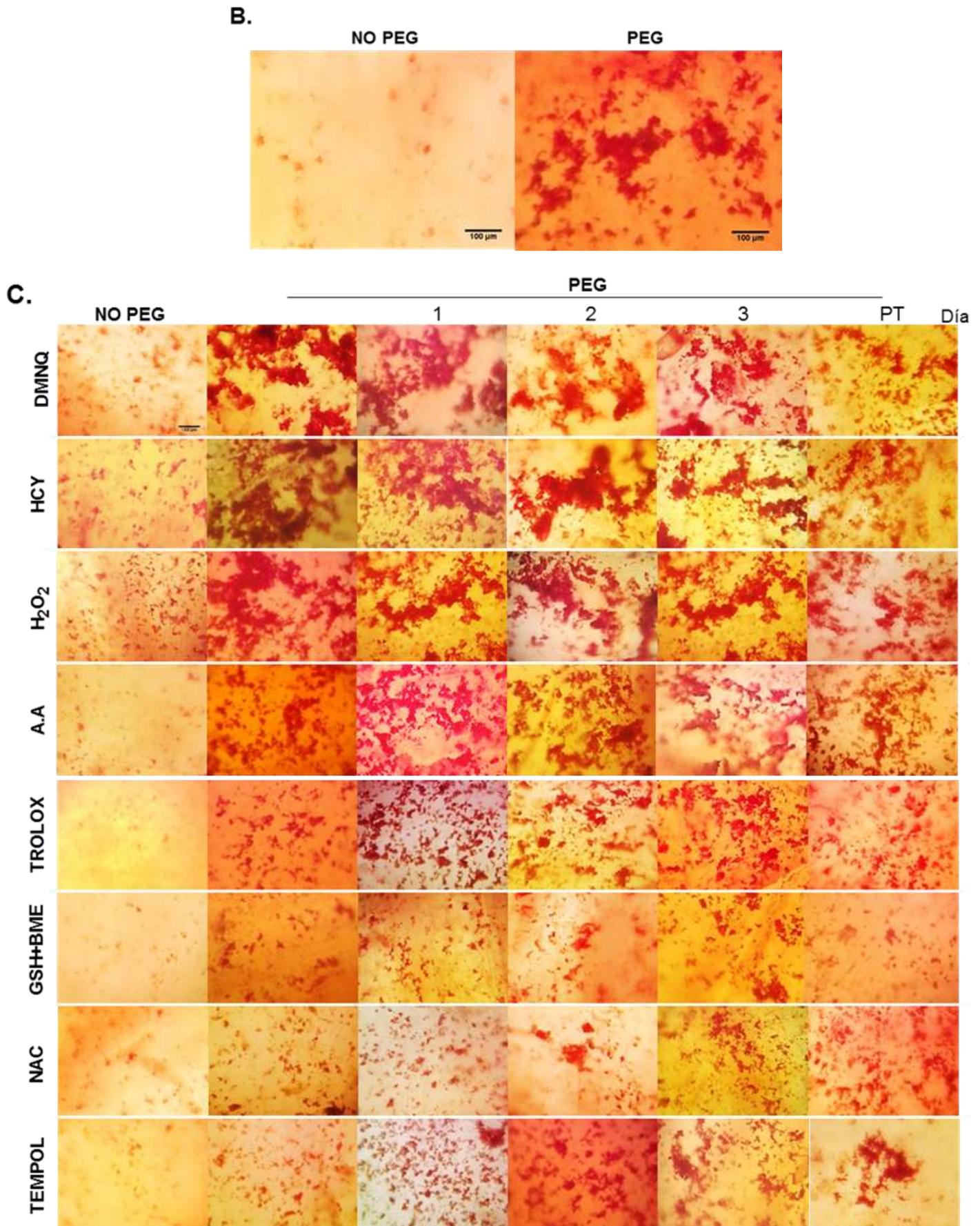
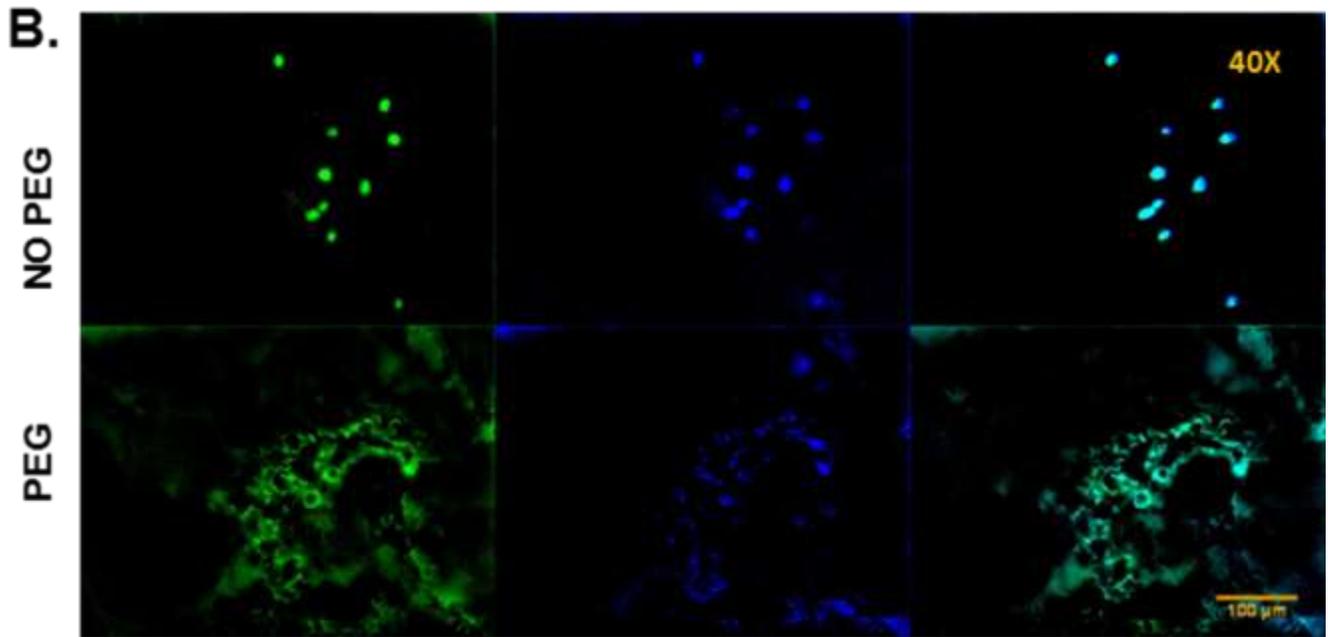
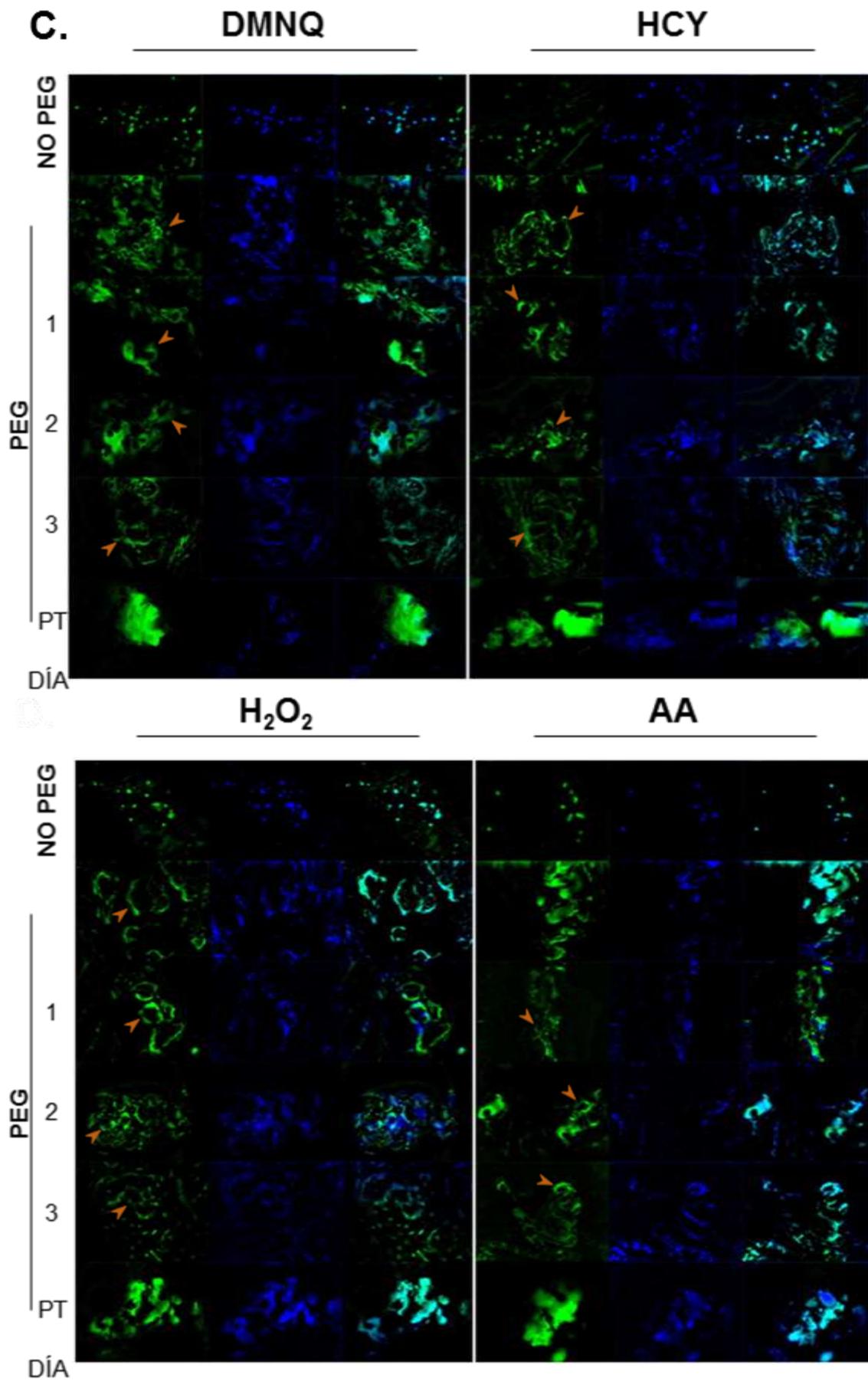


Fig. 3 ANILLOS DE ACTINA





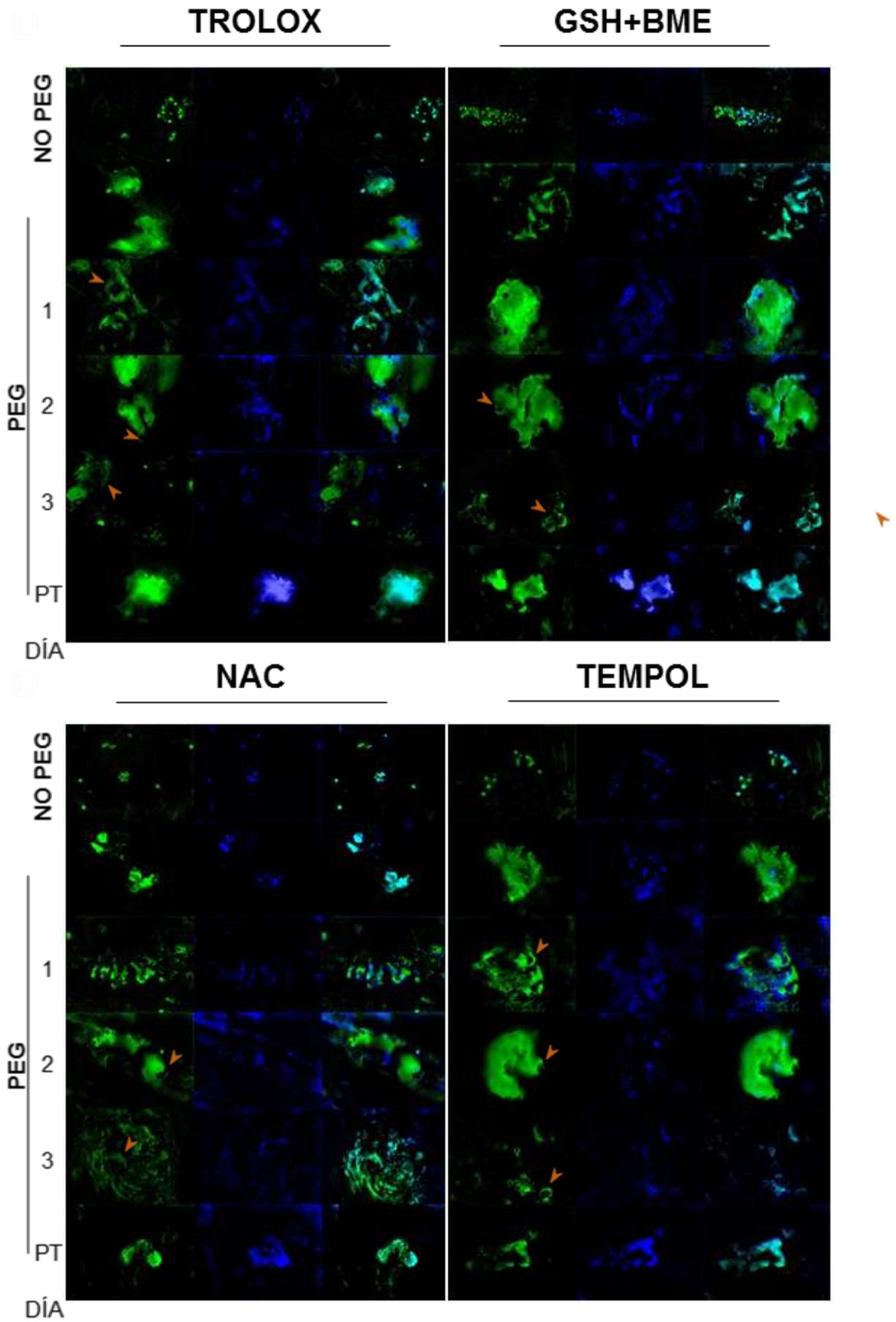


Fig. 4 LAGUNAS DE RESORCIÓN

