

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA HACIA EL LINAJE OSTEOCLÁSTICO EN DIFERENTES TIEMPOS DE APLICACIÓN DE FUERZA TENSIL.

**Presentado por:
María Alejandra Montero Córdoba**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
POSGRADO DE ORTODONCIA Y ORTOPEDIA MAXILAR
BOGOTA D.C
2016**

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA HACIA EL LINAJE OSTEOCLÁSTICO EN DIFERENTES TIEMPOS DE APLICACIÓN DE FUERZA TENSIL.

María Alejandra Montero Córdoba

Trabajo final presentado para optar por el título de Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar

Director:
Dra. NATALIA CARRILLO MENDIGAÑO
Msc
Profesor Auxiliar
Facultad de Odontología

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

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
POSGRADO DE ORTODONCIA Y ORTOPEDIA MAXILAR
BOGOTA D.C
2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco A Dios, por siempre estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el posgrado

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo

A mis profesores: Carlos Guerrero por sus enseñanzas y su disposición durante todo el proceso de la fase experimental y a la Dra. Natalia Carrillo, por su apoyo, su motivación, por su constante interés y acompañamiento en el desarrollo de este trabajo.

CONTENIDO

LISTA DE IMAGENES	7
LISTA DE TABLAS	8
RESUMEN.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. MARCO TEÓRICO.....	13
3.1 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.....	13
3.2 HEMATOPOYESIS.....	13
3.3 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.....	15
3.4 OSTEOCLASTOS	16
3.5 MARCADORES DE OSTEOCLASTOS.....	19
3.5.1 TRAP.....	19
3.5.2 ADAM 12.....	20
3.5.3 MMP9	21
3.5.4 ATPasa VACUOLAR.....	22
3.5.5 DC-STAM.....	23
3.5.6 INTEGRINA $\alpha\beta 3$	23
3.6 RESORSIÓN ÓSEA.....	24
3.7 MODELO PARA GENERAR CÉLULAS CON ACTIVIDAD OSTEOCLÁSTICA	25
3.8 PEG.....	26
3.9 NAC.....	27
4. OBJETIVOS	29
4.1 OBJETICO GENERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
5. MATERIALES Y METODOS	30
5.1 TIPO DE ESTUDIO: Experimental, in vitro	30
5.2 MUESTRA: CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (CMSP)	30
5.3 DIVISIÓN DE LA MUESTRA.....	30
5.4 CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA	31
5.5 FUSION CELULAR CON PEG.....	31
5.6 LAMINAS DE HUESO	31
5.7 SIEMBRA.....	32

5.8	APLICACIÓN DE FUERZA.....	33
5.9	FIJACION.....	33
5.10	DETERMINACIÓN DE LA FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE AL TARTRATO (TRAP)..	33
5.11	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	34
5.12	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA.....	35
5.13	ANALISIS ESTADISTICO	35
6.	RESULTADOS	36
6.11	EXPRESION DE LA ENZIMA TRAP AL 3, 5 Y 7 DIA DE CULTIVO.....	36
6.12	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA AL 3, 5 Y 7 DIA DE CULTIVO.....	42
6.13	EVALUACION DE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR OSTEOCLASTICO INTEGRINA B3 AL 3, 5 Y 7 DIA DE CULTIVO.	47
7.	DISCUSION.....	48
8.	CONCLUSIONES.....	53
9.	RECOMENDACIONES.....	54
10.	BIBLIOGRAFIA.....	55

LISTA DE IMAGENES

Imagen 1

Láminas óseas representativas de células con tinción TRAP positivas, grupo PEG; grupo F; grupo PEG+NAC; grupo F+NAC grupo (-fu, -F)

Imagen 2.

Microfotografías de tinción Coomassie para evaluar lagunas de resorción, grupo PEG; grupo PEG +NAC, grupo F; grupo F+NAC; grupo (-fu,-F)

Imagen 3

Microfotografías representativas de inmunofluorescencia, grupo F; grupo F+NAC; grupo (-fu,-F)

LISTA DE TABLAS

Tabla 1

Cantidad de células TRAP positivas observadas en los grupos F y grupos control negativo evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 2

Cantidad de células TRAP positivas observadas en los grupos PEG y grupos control negativo evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 3

Cantidad de células TRAP positivas, observadas en los grupos f y grupos PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo.

Tabla 4.

Cantidad de células TRAP positivas, en los grupos F evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo.

Tabla 5

Cantidad de células TRAP positivas, en los grupos PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 6

Cantidad de células TRAP positivas en los grupos F y los grupos (F+NAC) al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 7

Cantidad de células TRAP positivas en los grupos PEG y los grupos (PEG+NAC) al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 8

Cantidad de células TRAP positivas en los grupos PAG+NAC, y los grupos control negativo al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 9

Cantidad de células TRAP positivas en los grupos F+NAC, y los grupos control negativo al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 10

Número de lagunas de reabsorción evaluadas en los grupos PEG y grupo control negativo al 3, 5 y 7 día

Tabla 11

Número de lagunas de reabsorción evaluadas en los grupos F y grupo control negativo al 3, 5 y 7 día

Tabla 12

Número de lagunas de reabsorción en los grupos F y grupos tratadas con PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 13

Número de lagunas de reabsorción en los grupos F y los grupos F+NAC al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 14

Número de lagunas de reabsorción en los grupos PEG y los grupos PEG+NAC al 3, 5 y 7 día de cultivo

Tabla 15

Número de lagunas de reabsorción, en los grupos F evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo.

Tabla 16

Número de lagunas de reabsorción, en los grupos PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo.

RESUMEN

Células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) fueron aisladas mediante un gradiente de Fycoll-Hypaque y estimuladas con 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) durante 72 h en medio de cultivo RPMI 1640 y suero fetal bovino al 10%, con el objetivo de evaluar la capacidad de actividad resortiva. Un grupo de células fue sometido a fuerzas de 5,28g/cm² y otro grupo de células fueron fusionadas con Polietilenglicol (PEG), ambos evaluados en un periodo de 3, 5 y 7 días. Las células fueron sembradas sobre láminas de hueso cortical bovino estériles de aproximadamente 6 mm² x 0.5 de profundidad tratadas o no con N-acetilcisteína (NAC). Para esto, se dividieron en 6 grupos de la siguiente manera: 1. Células no fusionadas, no tratadas con fuerza (-fu, -F) 2. Células no fusionadas, no tratadas con fuerza + NAC (-fu, -F+NAC). 3. Células no fusionadas + fuerza. (F) 4. Células no fusionadas, + fuerza+ NAC (F+NAC) 5. Células fusionadas con PEG (PEG) 6. Células fusionadas con PEG + NAC (PEG + NAC). Las células se fijaron con metanol ácido acético en proporción 1:3; a los 3, 5 y 7 días de cultivo, luego se procedió a evaluar la actividad de la enzima tartrato resistente (TRAP). Posteriormente se identificó la proteína de membrana utilizada como marcador de osteoclastos: Integrina β3; por ultimo las células se retiraron de la lámina ósea y se evaluó la actividad resortiva sobre el hueso donde se cultivaron las células. Se encontró que al fusionar células con PEG, o aplicar una fuerza a células no fusionadas, se inducen marcadores característicos de células osteoclásticas y actividad resortiva, también de determino que NAC es un potente inhibidor de las actividades relacionadas con células resortivas.

1. INTRODUCCIÓN

El mantenimiento de la homeostasis ósea es crucial para el adecuado desarrollo del esqueleto durante toda la vida, éste depende de la interacción continua entre los osteoclastos, que degradan o reabsorben el hueso, y los osteoblastos, que forman hueso. Los orígenes de estas células están bien establecidos, los osteoblastos se derivan de células madre mesenquimales, mientras los osteoclastos son células altamente especializadas, multinucleadas que se derivan de las células madre hematopoyéticas, específicamente a partir de células del linaje monocito-macrófago(1). Estos dos tipos celulares, se encuentran muy relacionados con el movimiento dental ortodóntico, ya que una vez aplicada una fuerza ortodóntica sobre el diente se desencadenan una serie de fenómenos que activan el proceso de remodelado óseo involucrando eventos de resorción y aposición ósea lo que permite el desplazamiento dental.

Se han desarrollado varios modelos para obtener osteoclastos utilizando una variedad de células dentro de las que están: células mononucleares de sangre periférica, (CMNSP) y células madre embrionarias(1)(2)(3)(4), si bien en estos sistemas de estudio la generación de osteoclastos ha sido exitosa, el uso de diversos factores de estimulación y diferenciación osteoclástica elevan los costos para obtener este tipo células lo que limita el estudio básico de la resorción ósea. Otros sistemas que involucran factores mecánicos también han sido utilizados para lograr la diferenciación de osteoclastos; se ha reportado en la literatura que ante un estímulo mecánico las células del ligamento periodontal (LP) apoyan la osteoclastogénesis(5). Estudios realizados en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la UNAL sugieren que células fibroblastoides de origen gingival, células mononucleares de sangre periférica y células de origen monocito-macrófago sometidas a fuerzas y fusionadas con polietilenglicol (PEG) presentan actividad osteoclástica(6)(7)(8).

Ante la aplicación de un estímulo mecánico sobre el diente se generan factores que estimulan la diferenciación osteoclástica en el LP permitiendo el movimiento dental, pero aún no está bien establecido el origen exacto de estas células, se sugiere que pueden derivar de la activación de osteoclastos ya maduros presentes en el LP o de la proliferación de células madre de tejidos hematopoyéticos distantes o de las células madre locales(9), también se ha indicado que la tasa de reclutamiento o la diferenciación de osteoclastos podría depender del régimen de la fuerza y del nivel de fuerza aplicada sobre el diente(10)

Por lo tanto es importante evaluar si la diferenciación de las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) hacia el linaje osteoclástico es constante o presenta alguna modificación al aplicar una fuerza y al fusionarlas con PEG en diferentes periodos de tiempo, obteniendo un modelo sencillo y fácil de reproducir para el estudio de la actividad resortiva semejante al que puede ocurrir en un tratamiento ortodóntico.

2. JUSTIFICACIÓN

Las fuerzas ortodónticas aplicadas sobre el diente producen factores locales que permiten la activación de procesos de remodelado del ligamento periodontal y del hueso alveolar. Dentro de estos procesos la diferenciación de los osteoclastos es un paso fundamental e indispensable para que el movimiento dental ortodóntico tenga lugar ya que estas son las células encargadas de la reabsorción de la matriz ósea(11). Es por esto que tener un modelo de estudio de los osteoclastos nos permitirá ampliar el conocimiento de los fenómenos biológicos que se producen durante el movimiento dental y las variables que lo pueden modificar; adicionalmente podemos ampliar los conocimientos que involucran el proceso de reabsorción dental, evento indeseado durante el movimiento ortodóntico y también nos permitirá reconocer mecanismos de inhibición de la actividad resortiva, con lo cual se conseguiría dar mayor estabilidad y disminuir la recidiva luego del tratamiento ortodóntico. Dentro de este modelo de estudio, entender el comportamiento celular frente a diferentes tiempos de aplicación de la fuerza nos permitirá tener mayores indicios acerca de los efectos que las fuerzas ortodónticas ejercen sobre los osteoclastos y de esta forma progresar en el entendimiento de los eventos celulares producidos por la acción de las fuerzas ortodónticas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Las células madre hematopoyéticas (CMH) se caracterizan por su gran capacidad de auto-renovación y su pluripotencialidad, a partir de estas células se origina todos los tipos de células sanguíneas maduras mediante el proceso de hematopoyesis. Este proceso hematopoyético, tiene lugar principalmente en la médula ósea donde las CMH residen en microambientes especializados (nichos) que proporcionan los factores solubles necesarios para definir su quiescencia, renovación o diferenciación (15)

Durante la última década, se ha considerado la existencia de al menos dos subcompartimentos en el nicho de las CMH; el nicho endosteal, que se ha propuesto como una fuente de factores importantes para la quiescencia de las CMH, mientras que el nicho sinusoidal vascular ha sido implicado en el mantenimiento y regeneración de las CMH. Actualmente, los únicos métodos fiables para detectar estas células siguen dependiendo de la demostración de sus propiedades regenerativas, en lugar de métodos más directos. Esto es debido, en parte, a la inestabilidad de cualquier fenotipo hasta ahora identificado así como el reconocimiento de la heterogeneidad molecular y funcional de las CMH en ensayos de trasplante(13)

En cuanto a sus aplicaciones, las CMH fueron las primeras en ser trasplantadas con éxito hace más de medio siglo. Inicialmente sólo podían obtenerse a partir de la médula ósea, pero actualmente se obtienen mediante un proceso mucho menos traumático llamado aféresis, tras ser movilizadas a la sangre periférica o, más recientemente, a partir de la sangre del cordón umbilical(14)

3.2 HEMATOPOYESIS

La producción de células sanguíneas es un proceso complejo a través del cual una célula madre hematopoyética prolifera y se diferencia dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). La hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea, en donde una intrincada red de células estromales y sus productos, regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras(15).

Las CMH tienen dos características funcionales que las distinguen: son capaces de auto-renovarse (al dividirse, por lo menos una de las células hijas conserva las propiedades de la célula madre) y son multipotenciales (pueden dar origen a los distintos linajes sanguíneos). Estas células madre dan origen a células

progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación, pero conservan su potencial proliferativo, estas pueden ser multipotenciales, o bien, pueden estar restringidas a dos (bipotenciales) o a un solo linaje (monopotenciales). La CPH se bifurca en un progenitor mielóide común (PMC) y un progenitor linfóide común (PLC); Estas células responden a un determinado tipo y número de citocinas, evento que está definido por el número de receptores que cada progenitor presenta. La maduración posterior en cada uno de los linajes hematopoyéticos está definida por dos procesos fundamentales: la pérdida definitiva del potencial de auto-renovación y la adquisición de una identidad específica(15)(16)

Los progenitores mieloides PMC, dan lugar a unidades formadoras de colonias granulomonocíticas (UFC-GM), que a su vez dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (UFC-G) y unidades formadoras de colonias monocíticas (UFC-M). Una vez encaminadas en la vía de diferenciación, las UFC-G dan lugar a células maduras (eosinófilos, neutrófilos y basófilos); mientras que las UFC-M dan lugar a monocitos, y finalmente a macrófagos. A lo largo de toda la ruta de diferenciación, las células de linaje mielóide son reguladas por un amplio número de citocinas entre las que se encuentran: el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (FSC-GM), el factor estimulador de colonias de granulocitos (FSC-G), el factor estimulador de colonias de monocitos (FSC-M), la interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6) y el factor de células seminales (FCS), entre muchas otras(16)(17).

La producción de las células del linaje linfóide (linfocitos B, linfocitos T, células NK y algunas categorías de células dendríticas) es un proceso dinámico y complejo, el cual está determinado por combinaciones de factores intrínsecos y microambientales (18). La linfopoyesis, proceso por el cual se forman los linfocitos, comienza desde una célula madre hematopoyética, que gracias a la acción de las interleuquinas, en concreto la Interleuquina-7(IL-7), se especializa en tejido linfóide, el que a la vez por acción de la IL-3 y la interleuquina-4 (IL-4), se especializan en linfocitos T y linfocitos B, respectivamente(19)

Estos procesos también son controlados por programas genéticos en donde los genes que mantienen la capacidad de auto-renovación se apagan, al tiempo que los genes que regulan la diferenciación se encienden. De esta manera, los progenitores hematopoyéticos se diferencian a células precursoras, a través de una serie de eventos en donde grupos alternados de genes en asociación con diversos factores de crecimiento determinan el destino celular en donde cada célula madura tiene una identidad y función definitiva(16).

Además de las citocinas estimuladoras existe también un número considerable de citocinas que inhiben estos procesos, tal y como sucede con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 α y los interferones (IFN), entre otras. Estas

moléculas son capaces de disminuir los niveles de células madre y progenitoras hematopoyéticas mediante la inhibición de su proliferación; dicha inhibición puede ocurrir de manera directa -por inducir la disminución de la expresión de receptores de moléculas estimuladoras- o a través del efecto sinérgico entre dos o más factores, causando un efecto supresor en la proliferación y formación de colonias hematopoyéticas(15)(17).

Si bien, todo este proceso de proliferación y diferenciación de la célula madre, así como el crecimiento y desarrollo de células hematopoyéticas maduras es modulado por citocinas y factores de crecimiento, también están presentes las interacciones específicas entre las células madre y otras células dentro de un microambiente en particular llamado “nicho de células madre” que desempeñan un papel clave en la determinación del destino de la célula, lo que mantiene el número de éstas mediante el control de auto-renovación y diferenciación, es decir, que la hematopoyesis no es posible sin la influencia reguladora de microdominios específicos de la estructura de la médula ósea a pesar de que las células madre de por sí poseen la capacidad intrínseca de auto-renovación. Los sistemas endoóseos, mesenquimales y vasculares se han identificado como los principales componentes de regulación de los nichos de la CMH, sin embargo el concepto del nicho encarna la entidad física de todos sus componentes individuales(20)(21).

3.3 CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

Una célula mononuclear de sangre periférica (CMNSP), es una célula sanguínea caracterizada por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos, se diferencian de los eritrocitos y las plaquetas que no tienen núcleo, y de los neutrófilos, basófilos y eosinófilos que tienen núcleos polilobulados(22). Como se mencionó anteriormente este tipo de células presenta un origen común en la médula ósea y se diferencian a partir de una célula madre hematopoyética por efecto de diferentes citoquinas como: FSC-GM, FSC-M e IL-7, IL-3 y IL-4.

Las CMNSP Tienen una vida promedio de 60 días tiempo tras el cual, si no se encuentran activas mueren por apoptosis. Aunque también pueden convertirse en células fagocíticas fijas o células de patrullaje que llegan a sitios puntuales tras el estímulo adecuado. En los seres humanos, la frecuencia de estas poblaciones varía en los individuos; los linfocitos están normalmente en un intervalo del 70 - 90% de CMNSP, los monocitos oscilan desde 10 hasta 30% de CMNSP mientras que las células dendríticas son raras, siendo solamente 1 - 2% de la CMNSP(19)

Estas células se obtienen a menudo de la sangre usando Fycoll, un polisacárido hidrofílico que separa capas de la sangre; por el gradiente de centrifugación queda una capa superior de plasma, seguido por una capa de

CMNSP y una fracción inferior de células polimorfonucleares, eritrocitos y plaquetas(22)

3.4OSTEOCLASTOS

Los osteoclastos son células que se diferencian a partir de precursores hematopoyéticos mononucleares de la línea del monocito/macrófago y tienen la capacidad de reabsorber la matriz ósea calcificada y disolver la fase inorgánica, por tanto estas células son encargadas de la resorción y remodelación ósea(23).

Los osteoclastos se originan a partir de la célula madre mieloide y el precursor más temprano de identificación es la UFC-GM. Los pasos que conducen a la generación de UFC-GM implican los factores de transcripción PU.1, MITF y c-Fos, mientras que en esta etapa, la citoquina FSC-M estimula la proliferación y previene la apoptosis de los primeros progenitores osteoclasticos. Los Pre-osteoclastos también pueden derivar de la UFC-M, aunque con menor eficiencia. El factor de transcripción PU.1 es responsable de los primeros eventos de la osteoclastogénesis, el PU.1 contribuye a la represión de los genes de los neutrófilos durante la diferenciación de los macrófagos a través de la inducción de reguladores negativos. El PU.1 es un factor de transcripción para el gen c-fms que codifica al receptor de la citoquina FSC-M. El FSC-M establece un bucle autocrino de amplificación y también estimula a PU.1. Esta citoquina es indispensable para la proliferación y la supervivencia tanto de macrófagos y osteoclastos progenitores, es producida por un número de células, entre las que se encuentran las células estromales y osteoblastos. Estas células aumentan la producción de FSC-M por factores osteotrópicos, incluyendo la PTH (hormona paratiroidea) y las citocinas inflamatorias tales como TNF- α (factor de necrosis tumoral α) y la IL-1 (interleuquina 1)(24)

Como PU.1, el factor de transcripción MITF se expresa por el progenitor común de los macrófagos y osteoclastos y, al menos parcialmente, interactúa con PU.1, regulando selectivamente la expresión de la catepsina K, la isoforma osteoclasto específica de TRAcP:5b y el receptor de osteoclastos asociado OSCAR , que están acoplados con la diferenciación de los osteoclastos . La presencia de ambos PU.1 y MITF como promotores de genes diana permite que los precursores comprometidos respondan rápidamente a FSC-M y RANKL y reprogramen la expresión génica. De hecho, PU.1 también induce la transcripción del receptor RANK que, al reconocimiento de su ligando, RANKL, determina el compromiso hacia el linaje de los osteoclastos(24)

Entre los genes diana de MITF, el gen CIC7, que codifica el transporte de cloruro tipo 7, y el gen OSTM1, que codifica una molécula importante para la estabilización de proteínas CIC7, han sido reconocidos como fundamentales para

el fenotipo de los osteoclastos. Por lo tanto, PU.1 y MITF son reconocidos por desempeñar papeles relevantes también en etapas posteriores de la diferenciación de los osteoclastos. La proteína c-Fos contribuye a la formación del factor de transcripción heterodimérico AP-1. Este es inducido en una etapa posterior en comparación con PU.1 y MITF y es necesario para la diferenciación de osteoclastos(25)

La diferenciación de los osteoclastos requiere la vía de RANKL / RANK para ser activado. El RANKL es una glicoproteína que pertenece a la superfamilia de TNF, expresado por los osteoblastos, las células del estroma y, durante la inflamación, por ciertas células T y fibroblastos sinoviales. Las células diana-los osteoclastos- expresan su receptor RANK, la activación del receptor desencadena señales intracelulares que conducen a la expresión de un panel de genes osteoclasto-específicos. La actividad del RANKL es contrarrestada por su receptor señuelo, la OPG (Osteoprotegerina), que secuestra a RANKL impidiendo su unión al RANK. El equilibrio entre RANKL y OPG determina la resorción ósea en condiciones fisiológicas. La expresión de RANKL está finamente regulado por hormonas y factores de activación de la señal de cAMP / PKA, tales como la PTH, la PGE2 (prostaglandina E2), y por el receptor de la vitamina D3: VDR. También está regulada positivamente por la IL-1 en respuesta a TNF α (26)

La multinucleación de los osteoclastos se produce por fusión de preosteoclastos mononucleares. Este evento se rige por RANKL, que inicia una cascada de eventos que conducen a la liberación de señales quimiotácticas. Las quimiocinas MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos -1) y RANTES (del acrónimo: Activation, Normal T Expressed and Secreted: atrayente selectivo para linfocitos T de memoria y monocitos), desencadenan la fusión de células mononucleares comprometidas y permiten la transferencia de las señales de RANK a los núcleos fusionados. MCP-1 es obligatorio para este evento y actúa a través de sus receptores CCR2 y CCR4, que son inducidos por RANKL, y estimula la señal de PI3K (fosfoinosil-quinasa-3) activando la expresión génica de los osteoclastos a través de NFATc1 (factor nuclear de células T activadas) Este último también activa la expresión de la isoforma d2 del dominio V0 de la H⁺-ATPasa vacuolar y a la proteína DC-STAMP (proteína transmembranal específica de células dendríticas), ambos implicados en la fusión celular de los osteoclastos y la multinucleación. Otro factor involucrado en la fusión es MFR (receptor de fusión de macrófago)(24)

Luego del proceso de multinucleación se requieren los pasos finales de maduración para inducir la actividad completa. Estos incluyen la polarización de la célula, la organización de la membrana de sellado y el borde rizado que aíslan la laguna de resorción, y el transporte específico de membrana para trasladar los mecanismos moleculares de la resorción ósea a los sitios apropiados. Estos acontecimientos parecen ser desencadenados por el reconocimiento de la matriz mineralizada por la integrina α v β 3. Este receptor reconoce la secuencia RGD (Arg-Gly-As) de las proteínas óseas, tales como la osteopontina y sialoproteína ósea 2,

e inicia señales que reclutan las quinasas: c-Src y SYK, esenciales para eventos de fosforilación intracelulares que conducen a la remodelación del citoesqueleto y la polarización de las células. El patrón completo de activaciones aún no se ha reconocido. Sin embargo, los primeros estudios demostraron que el compromiso de avb3 induce la movilización del calcio en los osteoclastos(27)

Los osteoclastos maduros, son células multinucleadas que pueden ser tan grandes con un tamaño de 150 micras de diámetro y con un número de núcleos de hasta 50, dependiendo de la especie. En las secciones histológicas convencionales los osteoclastos presentan forma y tamaño variables y se adhieren a la superficie ósea a nivel de pequeñas excavaciones denominadas lagunas de resorción o laguna de Howship. Cuando la laguna de resorción está bien delineada, el osteoclasto está en una fase de resorción completa. Presentan un citoplasma finamente granular. Los núcleos se localizan generalmente en la zona opuesta a la matriz ósea, cada uno asociado con un complejo de Golgi y un par de centriolos. El retículo endoplásmico rugoso es escaso, mientras que las mitocondrias son numerosas, alargadas y localizadas especialmente en la región de la célula cercana a la superficie del hueso. Esta región también contiene muchos lisosomas, de aproximadamente 0,5 micras de diámetro, y vacuolas de aproximadamente 3 micras de diámetro, algunas de las cuales son positivas para el marcador de osteoclastos típico, la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP)(24)

Los osteoclastos muestran una polaridad marcada. La membrana plasmática cercana al hueso exhibe profundas e irregulares invaginaciones que representa la llamada frontera ondulante. El dominio de la membrana periférica se caracteriza por una extensa área de adhesión, que se encuentra bien conectada con la matriz ósea, llamada membrana de sellado. Esta área sella dinámicamente la laguna de resorción. La membrana plasmática restante es lisa, sin rasgos distintivos morfológicos, que representa el dominio basolateral. La membrana plasmática muestra una pequeña depresión denominado dominio de secreción funcional que se cree que está implicado en la transcitosis de los productos degradados de la matriz de la laguna de resorción al fluido intersticial. Los lisosomas son prominentes; ellos contienen diversas hidrolasas ácidas, entre las que está TRAP (isoforma 5b) y la catepsina K que se expresa abundantemente y específicamente(24)

La catepsina K ha sido reconocido por tener prominente actividad colagenolítica, lo que conduce a la destrucción de colágeno tipo I en el microambiente ácido de la laguna de resorción. En los osteoclastos, los lisosomas tienen la capacidad única de ser secretados hacia la laguna de resorción, que de hecho tiene un pH inferior a 4,0 y una concentración de calcio mayor de 25 mM. Las mitocondrias también están presentes en grandes números en los osteoclastos, conforme con la energía metabólica elevada requerida para la degradación de la matriz ósea. Están ubicadas estratégicamente en las proximidades de la frontera ondulante donde proporcionan el ATP necesario. La esperanza de vida del Osteoclasto varía

según la especie. In vitro, se reconoce algunos días en ratón, mientras que los osteoclastos de humanos y conejos pueden persistir en cultivo durante semanas. Al final de su ciclo de resorción, los osteoclastos se someten a la apoptosis en la mayoría de las especies(28)

3.5 MARCADORES DE OSTEOCLASTOS

Morfológicamente, los osteoclastos son células multinucleadas, que se distinguen de los megacariocitos porque están polarizados y se adhieren al hueso. Un criterio importante para la identidad de los osteoclastos es su capacidad de reabsorción. In vivo, esto se demuestra por la aparición polarizada y la presencia de la laguna de reabsorción o de Howship. Además, la concentración de fragmentos de colágeno liberados por su actividad proteolítica se puede medir en el suero y en la orina y éstos se utilizan en pacientes como biomarcadores óseos. Hay varios métodos para medir la resorción ósea in vitro, incluyendo la cuantificación del número de hoyos, su área y profundidad, así como la evaluación de la cantidad de fragmentos de colágeno liberados en medios acondicionados(24)

3.5.1 TRAP

La fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), es una enzima común en el sistema óseo e inmunológico. Se expresa por las células del linaje monocito incluyendo macrófagos y células dendríticas (DC). La enzima que también se conoce como fosfatasa ácida tipo 5, se identificó originalmente por su movilidad catódica única a pH 4 y se define además por su resistencia a la inhibición del L (+) –tartrato. TRAP es una proteína que contiene hierro y es capaz de hidrolizar una amplia gama de fosfato sustratos que incluyen nucleótidos, fosfatos de arilo y fosfoproteínas incluyendo osteopontina y sialoproteína ósea(29)

Los osteoclastos muestran una tinción intensa para TRAP en hueso normal y durante muchos años TRAP se ha utilizado como un marcador histoquímico de los osteoclastos. En la mayoría de otros tejidos normales la enzima presenta niveles bajos de actividad y es histoquímicamente indetectable excepto en los macrófagos alveolares pulmonares, donde hay fagocitosis activa de microbios transportados por el aire y otras partículas inhaladas. La enzima también se ha identificado en los osteoblastos y los osteocitos(29).

Aunque durante muchos años, TRAP fue considerado en gran medida un marcador de hueso, se ha demostrado que también se expresa por muchos tejidos no esqueléticos, es decir que se distribuye ampliamente en tejidos normales de roedores y humanos. Dentro de estos tejidos se incluye la piel, el timo, el bazo, el

hígado, el pulmón, el sistema nervioso y revestimientos del tracto gastrointestinal. TRAP también se ha detectado en las articulaciones y el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR), una enfermedad que implica que células inmunes expresan esta enzima, ocasionando la erosión del hueso subyacente al cartílago (30)(31)

TRAP es secretada por los osteoclastos durante la resorción ósea y la secreción se correlaciona con el comportamiento de resorción. Se cree que al ser esta enzima una pirofosfatasa, es probablemente la responsable de la remoción de pirofosfato, potente inhibidor de la solubilización de la apatita, considerado el primer paso esencial en la resorción (15). También se ha demostrado que durante la resorción realizada por los osteoclastos la TRAP se produce en vesículas transcitóticas que participan en el transporte de productos de degradación de la matriz a través de la células, las especies reactivas de oxígeno producido por TRAP ayuda a destruir el colágeno y otras proteínas en estas vesículas.(29)

La expresión de TRAP se asocia fuertemente con la activación y la diferenciación de osteoclastos, así como de macrófagos y otras células mono histiocíticas; la actividad de esta enzima se mejora en ciertos macrófagos activados, además se ha observado que los macrófagos derivados de monocitos humanos expresan abundante actividad TRAP en cultivo con medio de suero enriquecidas (30)

En experimentos donde se han analizado ratones con deficiencia de esta enzima se ha demostrado que la TRAP es esencial para la mineralización normal del cartílago en desarrollo y para el mantenimiento del esqueleto adulto. Estos ratones también muestran un deterioro de la función de los macrófagos(31)

La actividad de la TRAP se puede detectar en el suero de mamíferos en los que existe como un complejo con $\alpha 2$ macroglobulina. La actividad enzimática se aumenta patológicamente en el suero de pacientes que sufren condiciones que implican aumento de la resorción ósea, tales como la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo y osteoporosis (32)

3.5.2 ADAM 12

Las proteínas ADAM forman una familia de proteínas de superficie celular ancladas a la membrana las cuales están implicadas en la adhesión célula-matriz-célula, presentan una organización estructural común, incluyendo metaloproteasa, desintegrina, con dominios transmembrana y citoplasmático ricos en cisteína. Estas proteínas están involucradas en diversas funciones biológicas durante el crecimiento y diferenciación celular, incluyendo la fertilización, miogénesis, neurogénesis, el desarrollo de diversos tejidos epiteliales y diferenciación de los osteoclastos en el hueso. ADAM 12 está implicado en el desarrollo y / o regeneración del músculo esquelético, esta proteína regula la fusión de mioblastos para formar miotubos durante la miogénesis(33).

ADAM12 está involucrada en la diferenciación de osteoclastos multinucleados resultantes de la fusión de progenitores hematopoyéticos de linaje mieloide, también se ha informado que participa en la formación de células multinucleadas en tumores de células gigantes de hueso. Sin embargo en un estudio realizado no se logró detectar la expresión de ADAM12 en osteoclastos maduros marinos generados *in vitro*. Esto podría ser debido al hecho de que un pico de expresión transitoria de ADAM12 puede ocurrir cuando las células se fusionan, es decir que, la expresión de ADAM12 se modula durante la formación de osteoclastos, y no se expresan en las mismas etapas de diferenciación(34)

3.5.3 MMP9

Metaloproteinasa de matriz 9(MMP 9) es una clase de enzimas que pertenecen a la familia de zinc-metaloproteinasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular de una variedad de órganos incluyendo el hueso. Esta enzima proteolítica es altamente expresada en los osteoclastos y es importante para la degradación de la matriz extracelular durante la resorción ósea, así como la remodelación ósea. Se ha demostrado que RANKL puede aumentar la expresión de MMP-9 de una manera dependiente de la concentración(35)

En el recambio óseo, las MMP secretadas participan en la descomposición del colágeno, que a su vez permite la unión de los osteoclastos. Particularmente, la MMP-9 se asocia con la migración de los osteoclastos a través de la matriz de colágeno. Las metaloproteinasas de matriz también pueden romper el colágeno residual dejada por la catepsina K, después de que el pH se eleva en la laguna de resorción. Esta metaloproteinasa es también activa contra gelatinas (colágenos desnaturalizados) y los tipos de colágeno I y IV intactos. En el hueso de origen dérmico, se cree que la degradación de la matriz depende más de las MMP y menos en la catepsina K(36)

En un estudio(37) se analizó el efecto de la IL-1 α sola o RANKL y / o M-CSF en presencia de IL-1 α en la expresión de la enzima anhidrasa carbónica II (CAII), la catepsina K, y MMP-9 en células cultivadas de RAW264.7 por 14 días. Los investigadores detectaron que en presencia de IL-1 α , la expresión de CAII, la catepsina K, y MMP-9 se aumentó notablemente en células cultivadas con RANKL o con FSC-M + RANKL. Por otro lado, los niveles de expresión eran difíciles de detectar en células cultivadas con IL-1 α solo o con FSC-M en presencia de IL-1 α . Estos resultados sugieren que la expresión de CAII, la catepsina K y MMP-9 no es inducida por la IL-1 α y M-CSF, pero si por RANKL, y que sus niveles incrementan de expresión de acuerdo con la madurez y la diferenciación de las Células RAW264.7.

Los niveles de una MMP en los osteoclastos están influenciados por una serie de factores, como el entorno de los osteoclastos el cual es muy importante ya que los niveles de expresión de los ARNm de las MMP-9, -14, y -10 varían dentro de la

misma médula. La variación de la expresión de MMP-9 en diferentes áreas óseas ya ha sido reportada en ratones y conejos. Otro factor es la variabilidad de la especie animal, ya que hemos encontrado en el ratón in vivo pero no en el conejo, osteoclastos que exhiben MMP-12. También se informó de diferencias en la expresión de MMP-1/13 entre los roedores y otras especies. Estas variaciones en el nivel de expresión de las MMP también se relacionan de acuerdo con la noción general de que varias MMPs responden a reguladores locales de recambio óseo, tales como IL-1, IL-6, TNF- α , OPG, PGE2, ácido retinoico, y TGF beta (factor de crecimiento β) o de los cambios locales relacionadas con fuerzas mecánicas, consolidación de fracturas, desarrollo o condiciones de la enfermedad. Es decir que las diferentes conclusiones que se encuentran en la literatura sobre la presencia de MMP en los osteoclastos es probable que reflejen las condiciones de observaciones y no son necesariamente contradictorias(38)

En conclusión, se demuestra que la falta de consenso sobre las MMP osteoclástica en la literatura simplemente refleja la variabilidad de la expresión de MMP en los osteoclastos. Esta variabilidad tiene que ser considerado en el contexto de la capacidad de las células óseas para adaptar sus actividades de acuerdo a las diversas especificidades locales del esqueleto.

3.5.4 ATPasa VACUOLAR

Durante el proceso de resorción ósea, la etapa de acidificación extracelular está mediada por el complejo vacuolar H⁺-ATPasa (V-ATPasa), la cual acidifica con hidrogeniones la laguna y mantiene el equilibrio de hidrogeniones entre la laguna y el interior del osteoclasto(39)

La V-ATPasas se componen de al menos 13 subunidades distintas y varias de estas subunidades tienen múltiples isoformas. La expresión de estas isoformas se regula en un tipo y tejido celular específico. Se han identificado dos isoformas de la subunidad V0 de V-ATPasa, la, d1 y d2, en ratones y seres humanos. Ambas isoformas se expresan más abundantemente en los osteoclastos que en otros tejidos. En particular, la expresión de Atp6v0d2 es más específico que el de Atp6v0d1 durante la diferenciación de los osteoclastos, con lo cual se pone de relieve la importancia de Atp6v0d2 para la osteoclastogénesis; aunque la función exacta de Atp6v0d2 no ha sido dilucidado, se ha demostrado que la inactivación genética de Atp6v0d2 en ratones resulta en una marcado aumento de masa ósea debido a la deficiencia de osteoclastos. Curiosamente, la deficiencia de Atp6v0d2 no afecta la diferenciación de los osteoclastos o la actividad de la V-ATPasa en esta población de células. Más bien, la Atp6v0d2 es necesaria para la maduración eficiente de los osteoclastos(39)(40)

3.5.5 DC-STAMP

DC-STAMP (proteína dendrítica transmembrana específica) se ha descubierto en células dendríticas humanas (DC), pero también es expresada por macrófagos y osteoclastos, esta proteína presentan funciones distintas en cada tipo de células(41)

C-STAMP juega un papel vital y es importante en la fusión de osteoclastos mononucleares (MOC) y no tanto en el proceso de osteoclastogénesis. El nivel transmembranal de DC-STAMP disminuye de manera constante cuando los monocitos se diferencian en osteoclastos. Los precursores osteoclásticos responder a RANKL por internalización de DC-STAMP. El desplazamiento de DC-STAMP desde la superficie hasta el plasma conduce a una clasificación de MOC: DC-STAMP^{lo} y DC-STAMP^{hi} que representan células con más baja y más alta expresión de DC-STAMP en la membrana celular, respectivamente. Por tanto las células DC-STAMP^{lo} manifiestan mayor DC-STAMP intracelular que las células DC-STAMP^{hi} debido a la internalización de los DC-STAMP(42)

En ratones nocaout con deficiencia de DC-STAMP, se demostró el compromiso de la multinucleación de macrófagos y osteoclastos, con lo que se puede demostrar la necesidad de su presencia en la fusión celular y con ello contribuye a posterior producción TRAP(41).

3.5.6 INTEGRINA $\alpha\beta 3$

Las integrinas son receptores heterodiméricos de membrana que median la interacción entre célula-matriz extracelular (ECM), y célula-célula. Las integrinas proporcionan un enlace físico entre la ECM y el citoesqueleto celular. Los osteoclastos exhiben una alta expresión de la integrina $\alpha\beta 3$, que se une a una variedad de proteínas que contienen Arg-Gly-Asp (RGD), incluyendo vitronectina, osteopontina y sialoproteína ósea, el bloqueo de los anticuerpos de las integrinas $\alpha\beta 3$ inhiben la resorción ósea in vitro, in vivo, lo que sugiere que esta integrina juega un papel importante en la regulación de la actividad de los osteoclastos. Esta integrina es clave en la vinculación de la adhesión de los osteoclastos a la matriz ósea, en la organización del citoesqueleto, la polarización y a la activación de estas células para la resorción ósea. Las integrinas son indispensables para formar la zona de sellado sin la cual no podría ocurrir la resorción ósea (43).

3.6 RESORSIÓN ÓSEA

El osteoclasto es la célula responsable de la resorción de la matriz ósea. La resorción ósea es un proceso necesario para el desarrollo normal del esqueleto, por su adaptabilidad, y para su mantenimiento. Este proceso celular es esencial en el crecimiento, remodelación y reparación de hueso y esta, en condiciones normales, estrechamente acoplado al proceso de formación de hueso por el osteoblasto. Es el equilibrio entre estas dos actividades celulares que determinan la masa esquelética(24)

La resorción ósea consiste en la capacidad de los osteoclastos para disolver la matriz mineralizada y eliminar hidrolíticamente la matriz orgánica del hueso. Estos eventos no pueden ocurrir intracelularmente porque el hueso es demasiado amplio para interiorizarlo y destruirlo por fagocitosis. Sin embargo, los lisosomas son orgánulos ideales para la degradación tanto de los componentes inorgánicos y orgánicos de la matriz ósea, ya que son ácidos, una propiedad que permite la disolución de los cristales de hidroxapatita, y contienen enzimas que degradan la matriz y destruyen todos los demás componentes óseos(44)

La resorción se inicia con la hidratación del CO_2 por la anhidrasa carbónica tipo 2, (CAII), en ácido carbónico que luego se disocia en protones y en equivalentes de bicarbonato. Los protones se liberan en la laguna de resorción por el H^+ -ATPasa vacuolar, Y esta acidificación permite la disolución de cristales de hidroxapatita y la solubilización de iones calcio, cuya concentración alcanza valores mucho más elevadas que en los otros fluidos extracelulares (van de 25 a 40 mM). La liberación de carga positiva en la laguna de resorción es equilibrada por la liberación de iones cloruros cargados negativamente. Estos cloruros habían entrado a la célula a través del intercambiador de cloruro/ bicarbonato localizado en la membrana basolateral, que también sirve para equilibrar los equivalentes alcalinos producidos por la disociación del ácido carbónico. Todo esto para liberar calcio y fosfato y descubrir la matriz orgánica, conformada por de colágeno tipo 1 en un 95%, de esta manera queda lista para ser degradada por enzimas proteolíticas que incluyen hidrolasas ácidas, especialmente la catepsina K, liberadas de los organelos lisosomales, y metaloproteinasas, especialmente la MMP9, liberadas de la vesícula endosomal. La solubilización de hidroxapatita precede la degradación de la matriz orgánica y es obligatorio para este último evento. También es claro que la resorción ósea requiere grandes cantidades de energía para bombear protones a la laguna de resorción y contrarrestar el efecto búfer por los fosfatos liberados por la hidroxapatita(45)

Al final de la resorción ósea, los productos de degradación de la matriz tienen que ser liberados a los fluidos extracelulares. En 1997, los grupos de Horton y Vaananen propusieron que este evento se rige por un proceso de transcitosis que implica la zona central del borde rizado, implicado en la actividad endocítica; y de la membrana opuesta, formado por el dominio funcional secretor, que participa en

la exocitosis. Por lo tanto, el transporte de membrana se considera obligatorio para la función de los osteoclastos(46)

En 1991, se propuso la existencia de una vía alterna para la liberación de los productos de la resorción ósea, basado en las altas concentraciones de calcio, que inducen un fenotipo de osteoclasto de alta motilidad. Cuando la concentración de calcio en la laguna de resorción alcanza niveles umbrales, que se estima en rangos de mM por encima del nivel fisiológico, la resorción ósea se interrumpe, las células se vuelve móviles y se mueven lejos de las cavidades de resorción, perdiendo la adherencia a la matriz ósea. Esto permite que los iones y los productos orgánicos de la matriz degradada se diluyan rápidamente en el medio ambiente circundante, volviendo la concentración de calcio extracelular al nivel fisiológico(24)

3.7 MODELO PARA GENERAR CÉLULAS CON ACTIVIDAD OSTEOCLÁSTICA

Actualmente se ha logrado inducir osteoclastos maduros a partir de células madre hematopoyéticas e incluso a partir de células madre embrionarias totipotentes. El potencial de los precursores de los osteoclastos (ACO) para diferenciarse a osteoclastos maduros en cultivo se mantiene por una variedad de células, que incluyen, además de células madre hematopoyéticas, las unidades formadoras de colonias (UFC). Okuyama y col(47) han demostrado una alta variabilidad en el potencial de diferenciación de los osteoclastos a partir de precursores cultivados en presencia de suero y en diferentes tipos de células del estroma.

Se han estudiado diferentes moléculas que son importantes para la osteoclastogénesis, una de estas moléculas críticas, el factor de diferenciación de osteoclastos: el ligando de la OPG, se determinó como factor esencial para inducir el desarrollo de los osteoclastos junto con el factor estimulante de colonias de macrófagos en cultivos inoculados solamente con una línea celular precursora de osteoclastos. Las células que se obtuvieron expresaron la fosfatasa ácida resistente al tartrato, un marcador específico del linaje de los osteoclastos, posteriormente se localizaron en la periferia de las colonias y finalmente lograron su maduración a células multinucleadas capaces de reabsorber hueso. Por tanto el factor estimulante de colonias de macrófagos y el ligando de la OPG, que son producidos por las células del estroma, promueven la osteoclastogénesis en colonias enteras, lo que indica que la ubicación y el mantenimiento de los osteoclastos maduros, así como el crecimiento y diferenciación de precursores de osteoclastos están reguladas por estos dos factores(47)

Grigoriadis y col(48) han demostrado que, en cultivos de células que expresan marcadores de macrófagos CD18 y CD11b en presencia de FSC-M y RANKL

durante 10-14 días se logra la diferenciación y la formación de osteoclastos multinucleados que expresan TRAP y muestran anillos de actina prominentes. La inmunotinción y microscopía confocal demuestra que estas células expresan los marcadores de osteoclastos integrina $\alpha\beta 3$ y catepsina K, y el análisis por SEM (microscopio electrónico de barrido) confirma la presencia de abundantes lagunas de resorción. Las células cultivadas en ausencia de RANKL no muestran la formación de osteoclastos ni lagunas de resorción.

En otro estudio realizado por Okuyama y col(49) investigaron los mecanismos de la osteoclastogénesis desde las primeras etapas, donde examinaron los efectos de la adición del factor de crecimiento VEGFR-1 (proteína quimérica), en el desarrollo de los osteoclastos a partir de cultivos de células madre embrionarias. En este estudio se determinó que la adición de VEGFR-1/Fc afectó el desarrollo no sólo de las células endoteliales sino también de ACO, UFC-M, y de las células eritroides, también se analizó el papel del receptor de la tirosin quinasa c-kit, donde determinaron que el desarrollo de los osteoclastos a partir de células madre embrionarias es totalmente c-Kit independiente.

Los Osteoclastos se pueden generar a partir de células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos. Debido a esto se cree que el FSC-GM no es crítico para el desarrollo de los osteoclastos, o que las señales normalmente proporcionadas por FSC-GM podrían ser compensadas por otras moléculas. En contraste, los ratones que presentan una mutación en el gen que codifica el factor estimulante de colonias de macrófagos (FSC-M), carecen de FSC-M funcional, y desarrollan osteopetrosis causado por la ausencia de osteoclastos. Por lo tanto, la señalización a través de c-fms, receptor de FSC-M, parece ser esencial para la osteoclastogénesis(50)

3.8PEG

El polietilenglicol (PEG) es un polímero hidrófilo que causa la deshidratación de las superficies de membrana, promoviendo un estrecho contacto entre ellas. Esta capacidad deshidratante deriva del hecho de que PEG, como un polímero dinámico con un gran volumen hidratado, aumenta el potencial químico del agua en una superficie de la membrana. Debido a su capacidad de agregación, PEG se utiliza ampliamente para mediar la fusión célula-célula en la producción de híbridos de células somáticas que incluyen los hibridomas y en la inyección de fusión de macromoléculas en células cultivadas a partir de eritrocitos o liposomas(51).

Existen dos pasos importante para que el PEG induzca la fusión de membranas celulares: el primero es la agregación de las células antes de la fusión y segundo, la desestabilización de las membranas de las células agregadas, permitiendo el proceso final de fusión, sin embargo, la fusión entre vesículas agregadas o entre

células ocurre cuando se utilizan altas concentraciones de PEG de bajos pesos moleculares (52)

Los primeros estudios propusieron que PEG induce la fusión de membranas por: (1) modificación de la estructura y propiedades dieléctricas del agua; (2) alteración del orden molecular de la bicapa en el punto de contacto debido a la agregación y la deshidratación; (3) la inducción de estructuras no bicapa; (4) actuando como un detergente para alterar la estructura bicapa; (5) la unión a las vesículas de reticulación y (6) inducción de la separación de fases que desestabiliza la bicapa. (51)

Klaus Arnold y col demostraron que la acción de PEG en la promoción de la fusión célula-célula no era debido a efectos tales como la absorción de la superficie o solubilización, en su lugar PEG actuaba simplemente por exclusión de volumen, lo que resulta en una fuerza osmótica que conduce a un estrecho contacto entre membranas en una región deshidratada (53)

Debido a que la agregación no puede distinguirse de la fusión se han exigido satisfacer tres criterios para concluir de que se ha producido la fusión: (1) mezcla de componentes de la membrana, (2) mezcla de compartimentos internos, y (3) un aumento de diámetro de la vesícula (52)

3.9NAC

La N-acetilcisteína (NAC) es un tiol antioxidante producido por el cuerpo, que sirve como un precursor en la síntesis del glutatión, aumentando los niveles de éste. El glutatión desempeña un papel importante en la protección de las células al daño de radicales libres derivados del oxígeno y de otros compuestos tóxicos. El Estímulo de la síntesis de glutatión después de la administración de NAC se traduce en una mayor disponibilidad de glutatión para la desintoxicación de radicales libres derivados del oxígeno(54)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen principalmente por las mitocondrias en las células como un subproducto del metabolismo normal. Estos incluyen radicales superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo (OH^-). Cuando existe un desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes se genera un estrés oxidativo(55); ROS en altas concentraciones causan este estrés oxidativo que conlleva a fenómenos perjudiciales, incluyendo la respuesta inflamatoria, la apoptosis, o la isquemia. Además se ha demostrado que los osteoclastos pueden ser activados por ROS para mejorar la resorción ósea(56)

El RANKL es esencial para la diferenciación de células de médula ósea del linaje monocito-macrófago (BMM) a osteoclastos. la estimulación del RANKL en células BMM aumenta el nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de una cascada de señalización que implica TNF (factor de necrosis tumoral) del receptor del factor asociado (TRAF 6), Rac1, y NADPH (nicotinamida

adenina dinucleótido fosfato) oxidasa 1 (NOX 1). Luego de la unión de RANKL con su receptor RANK y del reclutamiento de TRAF 6 se inicia la activación de la cascada de señalización mediadas por las proteín-quinasas activadas por mitógenos (MAP), que incluyen la kinasa c -jun N-terminal (JNK), quinasa MAP p38 (p38), y la quinasa regulada por señal extracelular (ERK). La JNK1-activa la señalización de c-Jun en cooperación con el factor nuclear de células T activadas (NFAT) clave para la diferenciación de osteoclastos regulado por RANKL(56)

El mecanismo por el cual ROSs activa las MAP quinasas no se entiende completamente. Sin embargo la activación de estas quinasas por una serie de estímulos, incluyendo factores de crecimiento y citoquinas, parece requerir generalmente a ROS(57).La Aplicación de N-acetilcisteína (NAC) bloquea la actividad de Nox 1, proteína que conduce a la formación de ROS, lo que inhibe las respuestas de las células BMM al RANKL, reduciendo la producción de ROS, igualmente reduce la activación de JNK, p38 y ERK, y por tanto suprime la diferenciación de los osteoclastos(56)(57).

Zafarullah y col(55) Refieren que NAC puede secuestrar ROS, sirviendo como agente reductor y que la activación del NF-kB en respuesta a una variedad de señales (IL-1, TNF, H₂O₂) también puede ser inhibida por NAC. Cao y col(58) reportan que las citoquinas pro inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , y la IL-6 y el estrés oxidativo son capaces de estimular la diferenciación y la activación de osteoclastos, además las especies reactivas de oxígeno (ROS) estimulan directamente la formación y la activación de osteoclastos, lo que conduce a la resorción ósea. En este estudio se demostró que la suplementación con NAC en la dieta de ratas aumenta la defensa oxidativa, disminuyendo la diferenciación de osteoclastos a partir de células de médula ósea y también disminuyo la expresión de ITGB3, un marcador de osteoclastos. Además, se encontró que NAC disminuye la formación de osteoclastos en células RAW similares a osteoclastos (en presencia de RANKL). También se ha demostrado que NAC reduce la expresión de la ciclooxigenasa-2. (54)(55)(59)

Chen y col(60), demuestran que en precursores osteoclásticos junto con osteoblastos el etanol estimula la expresión del RANKL resultado de la generación de ROS asociado con la inducción de la expresión de NOX, y la activación y acumulación de ERK seguido por la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) lo que resulta en un incremento de RANKL aumentando la osteoclastogénesis. En presencia del antioxidante NAC, la cascada activada ROS / ERK / STAT3 / RANKL en osteoblastos se atenúa, al parecer como resultado de la inhibición de la inducción de NOX mediada por etanol.

NAC se ha usado clínicamente en personas mayores de 30 años, principalmente como un agente mucolítico suprimiendo el estrés oxidativo, la administración oral de NAC en dosis de hasta 8000 mg / día no causa clínicamente reacciones adversas en estudios en seres humanos, por lo cual es considerado como un medicamento seguro con efectos secundarios menores (náuseas, vómitos y ardor de estómago)(54)

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETICO GENERAL

Evaluar la capacidad de diferenciación de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) hacia el linaje osteoclástico en diferentes tiempos de activación con fuerzas.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la actividad TRAP, en CMNSP sometidas a fuerza durante 3, 5 y 7 días y compararla con células CMNSP fusionadas con PEG y tratadas con NAC.
- Evaluar marcadores característicos de osteoclastos, en CMNSP sometidas a fuerza durante 3, 5 y 7 días y compararla con células CMNSP fusionadas con PEG Y tratadas con NAC.
- Evaluar actividad resorptiva, en CMNSP sometidas a fuerza durante 3, 5 y 7 días y compararla con células CMNSP fusionadas con PEG y tratadas con NAC.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 TIPO DE ESTUDIO: Experimental, in vitro

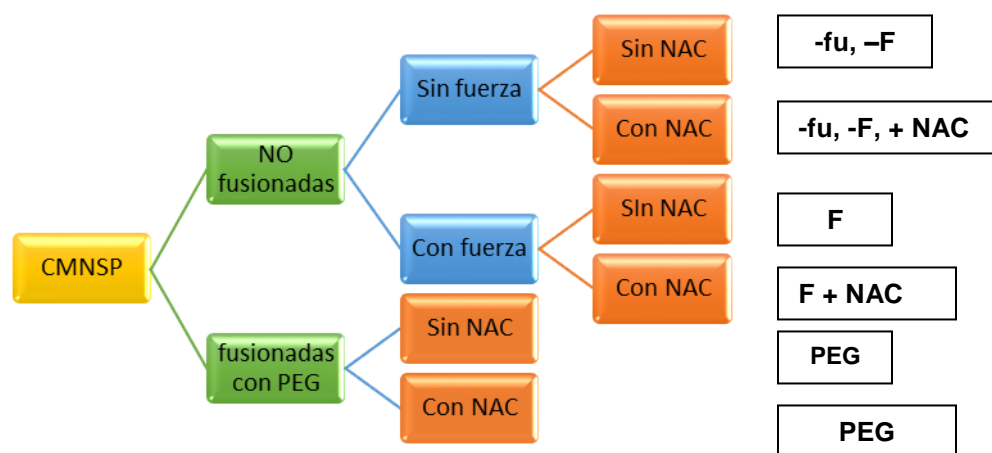
5.2 MUESTRA: CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (CMNSP)

Las células mononucleares de sangre periférica se adquirieron tomando una muestra de 20 mL de sangre periférica de un donante voluntario, de 27 años de edad, género femenino, sano sistémicamente, mediante punción en el pliegue anterior del brazo, con un jeringa previamente heparinizada con 2 μ L de heparina sódica 5000 UI en 5mL. Posteriormente se diluyo con 30 mL de RPMI 1700 y se agregó Fycoll-Hypaque en una proporción de 1:3 (v:v) se centrifugo a 1200 r.p.m durante 30 minutos. Mediante una pipeta se tomó la interface opaca que contiene las CMNSP depositándolas en un nuevo tubo. Se realizaron tres lavados con medio RPMI 1700 y se centrifugaron a 1200 rpm durante 6 minutos cada uno.

5.3 DIVISIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se dividió en 6 grupos.

1. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza (control negativo) **(-fu, -F)**
2. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza, con NAC **(-fu, -F, + NAC)**
3. CMNSP no fusionadas tratadas con fuerza **(F)**
4. CMNSP no fusionadas tratadas con fuerza, con NAC **(F + NAC)**
5. CMNSP fusionadas con PEG (control positivo) **(PEG)**
6. CMNSP fusionadas con PEG, con NAC **(PEG + NAC)**



Para cada grupo se utilizaron 12 láminas de hueso los cuales fueron evaluadas en tres tiempos diferentes: al 3, 5 y 7 día

5.4 CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA

Las células se cultivaron en cajas Petri con medio RPMI 1700 suplementado con SFB (suero fetal bovino) al 10 % (v/v), en presencia de 10 μ L de Fitohemaglutinina (PHA) con el fin de estimular Linfocitos T, se llevaron a incubadora a 37°C, 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%. Luego de 72 horas de cultivo se recolectaron las células en suspensión y las adherentes las cuales fueron desprendidas con una solución de PBS-EDTA 1mM (p/v) por 10 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas con medio libre de SFB y centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 5 minutos.

5.5 FUSION CELULAR CON PEG

Luego de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo sobre gasa estéril para eliminar todo residuo de RPMI y evitar diluir el polietilenglicol (PEG). Se agregó 50 μ L de PEG de peso molecular 3000, previamente calentado a 37° C, se agito suavemente, mediante golpes con el dedo en la base del tubo, para homogenizar el botón celular en el PEG y se llevó a 37° C durante 5 minutos. A partir de ese momento se adicionó 40 μ L de RPMI cada 60 segundos por 5 minutos, posteriormente 80 μ L de RPMI durante 5 minutos y 160 μ L de RPMI durante 5 minutos, Posteriormente las células se centrifugaron por 5 minutos a 1200 rpm y se lavaron dos veces con RPMI para retirar el PEG. Posteriormente se suspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado en SFB al 10% La técnica de fusión, los volúmenes del medio y los tiempos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Moniere- Faugere et al. 2001

5.6 LAMINAS DE HUESO

Se utilizó hueso cortical de pelvis bovina, el cual se cortó transversalmente con sierra, se pulió con esmeril, discos de carburo de grano grueso y fino y piedra rosada hasta obtener laminas con un área de 6mm² y grosor de 0.5mm. Estas laminas se sumergieron en una solución de SDS (Dodecil sulfato de sodio) al 10% por 8 horas bajo agitación continua, se lavaron doce veces con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, posteriormente se esterilizaron con etanol al 70% por 60 minutos y finalmente se lavaron dos veces con medio RPMI suplementado con 10% SFB. Las cajas fueron esterilizadas finalmente con luz ultravioleta durante un día.

5.7 SIEMBRA

Se utilizaron 12 láminas de hueso para cada grupo evaluado, realizando la siembra en tres cajas de 24 pozos cada una, se colocaron aproximadamente 450 células en 35 μ L con un porcentaje de viabilidad del 100%. Los grupos se distribuyeron de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6
A	-fu - F	-fu-F, +NAC	F	F+ NAC	PEG	PEG + NAC

	1	2	3	4	5	6
B	-fu - F	-fu-F, +NAC	F	F+ NAC	PEG	PEG + NAC

	1	2	3	4	5	6
C	-fu - F	-fu-F, +NAC	F	F+ NAC	PEG	PEG + NAC

Distribución de la muestra: se utilizaron 3 cajas de siembra **A** (evaluación al 3 día), **B** (evaluación al 5 día), **C** (evaluación al 7 día), cada una con los 6 grupos: **1.** CMSP no fusionadas, no tratadas con fuerza (-fu, -F). **2.** CMSP no fusionadas, no tratadas con fuerza, con NAC (-fu, -F, + NAC), **3.** CMSP no fusionadas tratadas con fuerza (F), **4.** CMSP no fusionadas tratadas con fuerza, con NAC (F +NAC), **5.** CMSP fusionadas con PEG (control positivo) (PEG), **6.** CMSP fusionadas con PEG, con NAC (PEG +NAC)

A cada lamina de hueso estéril del grupo de fusión (24 en total), se les aplico 10 μ L de la suspensión de células fusionadas con PEG en 30 μ L de medio de cultivo; para permitir la adhesión de las células se dejaron durante 4 horas en incubadora a 37°C, 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%. Trascurrido este tiempo se agregó 400 μ L de medio con SFB al 10% en cada pozo, para los grupos de células tratadas con NAC, se agregó 30Mm a cada pozo de preparado de NAC con PBS.

5.8 APLICACIÓN DE FUERZA

Los grupos a los que se les aplicó fuerza (+F), (24 en total), se posicionaron en un motor rotatorio horizontal (Rotatorque – ColeParmer®) a velocidad No. 8 (44 r.p.m), trascurrido 3 días se retiraron las 8 láminas y se fijaron las células con 43 µL de formaldehído diluido en 400 µL de PBS. Así mismo se procedió con los diferentes grupos. Para los días 5 y 7, se siguió el mismo protocolo. Para determinar la fuerza a la cual fueron sometidas las células se utilizó la fórmula descrita en el artículo ya publicado(61). Al calcular la fuerza ejercida sobre las células se estableció que fue de 5.28 gr/cm².

$$P = (m \times r \times \text{r.p.m.}^2 \times \pi^2) / (A \times 9.8 \times 900),$$

Donde P es la presión en Kg por cm², m: la masa del medio, r: el radio del motor rotatorio, r.p.m: revoluciones por minuto y A: el área de contacto entre el medio y las células.

Siendo m= 0.015 gr, r= 0.065m, A=4 cm² y r.p.m=44

5.9 FIJACION

Cada grupo de células se fijaron al 3, 5 y 7 día con 43 µL de Formaldehído, dejándolas con 400 µL de PBS a temperatura ambiente. Posteriormente se evaluó la actividad de la enzima TRAP, se realizó prueba de inmunofluorescencia para el anticuerpo: Integrina β₃ y por último se realizó evaluación de la actividad resorptiva.

5.10 DETERMINACIÓN DE LA FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE AL TARTRATO (TRAP).

Este procedimiento fue realizado según protocolo del grupo de investigación de patología de la universidad de Nottingham(62), se retiró el PBS en el que se encontraban las láminas óseas y se dejó secar al medio ambiente. Para obtener la tinción, primero se preparó el buffer veronal 10 mL que contenía barbitona de sodio (ácido barbitúrico 0.006625 g y 0,01375 g de NaOH) y 0,048375 g de acetato de sodio. A este buffer veronal se le adicionó 0,0291 g de tartrato de sodio-potasio, luego, se agregó una solución formada por 375 µL de pararrosanilina hexasotizada y 375 µL de nitrito de sodio en hielo. Después, se

adicionó 0,00475g de naftol fosfato MX-ASB1 (Sigma-Aldrich), usado como sustrato de la enzima TRAP. A esta solución se le ajustó el pH a 4.6 +/- 0.2 usando ácido clorhídrico. Cada lámina fue incubada con 300 μ L de esta solución a 37 ° C durante 2 h, se hizo un solo lavado con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

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

5.11 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta sobre los siguientes grupos: 1. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza (-fu, -F), 2. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza + NAC (-fu, -F), 3. CMSP no fusionadas tratadas con fuerza, (F) 4. CMNSP no fusionadas tratadas con fuerza + NAC (F+NAC). Para determinar la expresión del marcador integrina β 3 generado en cabra. Las láminas de hueso fueron lavadas 3 veces con una solución de PBS, dejando 2 minutos entre cada lavado, a cada lamina se agregó 30 μ L de la solución con el anticuerpo primario y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda. Las láminas se lavaron nuevamente 3 veces con solución de PBS y se secaron por debajo con una servilleta y se cambiaron de caja. Se agregó 30 μ L de solución de anticuerpo secundario FITC anti-cabra, (2 μ g/mL, Santa Cruz Biotechnology[®]), junto con la tinción DAPI y se incubó durante 30 minutos en cámara húmeda y en total oscuridad. Se lavaron 3 veces con PBS cada 2 minutos. La lámina ósea se colocó sobre una laminilla porta objetos, sobre las láminas de hueso se colocó una laminilla cubre objetos, se colocó aceite de inmersión y se observó la inmunofluorescencia en un microscopio Vanguard® con un objetivo 100x. Toda la superficie de cada una de las láminas óseas fue evaluada y se tomaron varias fotos representativas para cada grupo. Para detectar la positividad de la prueba, se observaron primero las células con luz blanca y estas mismas deberían emitir fluorescencia cuando fueran observadas con el lente indicado para esto. Si no había presencia de ninguna masa fluorescente se declaró negativa para dicho marcador.

5.12 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA

Para poder observar las lagunas de reabsorción se procedió primero a retirar las células de las láminas óseas. Para lisar las células se utilizó el detergente SDS al 10% (dodecil- sulfato sódico), esta solución se dejó por 30 minutos bajo agitación continua, luego se procedió a desprender mecánicamente las células y residuos persistentes utilizando un cepillo dental de cerdas suaves, se lavaron con agua destilada cinco veces, bajo agitación continua.

Posteriormente las láminas fueron teñidas con el colorante azul de Coomassie (0.25% Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético 40% H₂O) por 30 minutos. El hueso se decoloró con una mezcla de metanol, ácido acético y agua (50:10:30%, V/V) dejándolo actuar por 15 minutos. Finalmente, las láminas fueron lavadas con agua destilada bajo agitación continua y se secaron a temperatura ambiente. Para realizar el conteo se tomaron fotos representativas de cada grupo, evaluadas con el objetivo 40X en un microscopio de luz Vanguard®, con una cámara Panasonic® DMC-FHS. Se contó el número de lagunas de reabsorción en cada campo y se describió su morfología.

5.13 ANALISIS ESTADISTICO

Todos los datos se presentan como el promedio calculado de 4 repeticiones en cada uno de los grupos evaluados en tres periodos de tiempo: al 3, 5 y 7 día. Las comparaciones estadísticas entre los grupos de tratamiento se realizaron mediante análisis de varianza ANOVA de Doble vía complementado con un test de comparaciones múltiples de Fisher. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.11 EXPRESION DE LA ENZIMA TRAP AL 3, 5 Y 7 DIA DE CULTIVO

Durante la observación al microscopio de todas las láminas óseas se identificaron en todos los grupos evaluados masas de células morfológicamente irregulares, de tamaño variable, con una coloración que vario de una tonalidad café a rojo ladrillo presentando diferentes intensidades de color.

En las láminas óseas del grupo PEG se observó que las células se encontraban agrupadas en masas de mayor tamaño, con forma irregular y con alta intensidad de coloración. El patrón de ubicación fue uniforme en todo el recorrido del hueso (Imagen 1. A.B) a diferencia del grupo de F (grupo de aplicación de fuerzas), en las que se observaron pequeños grupos celulares, algunos redondeados y ubicados predominantemente en la periferia del hueso, en estas láminas se observaron variaciones en la intensidad de color.(Imagen 1. C.D). Para los grupos tratado con NAC se observaron en su mayoría grupos celulares pequeños y dispersos con una intensidad baja del color. (Imagen 1 E.F.G.H)

La cantidad de células TRAP positivas tanto en el grupo F, como en el grupo PEG fue mayor en comparación al grupo que no se fusiono ni fue sometido a fuerza (-fu, -F), en los tres periodos de tiempo evaluados (3, 5 y 7 día de cultivo), presentando una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Tabla 1 y 2).

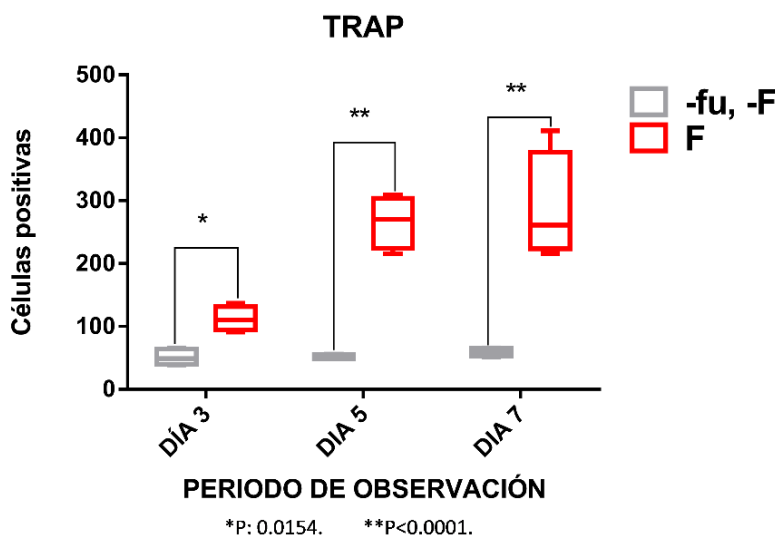


Tabla 1. Cantidad de células TRAP positivas observadas en el grupo sometido a fuerza (F) evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo, en comparación con el grupo no sometido a fuerza ni a fusión (-fu, -F). Diferencia estadísticamente significativa al 3 día de cultivo con un valor de *P: 0.0154, y con un valor de **P<0.0001 al 5 y 7 día de cultivo.

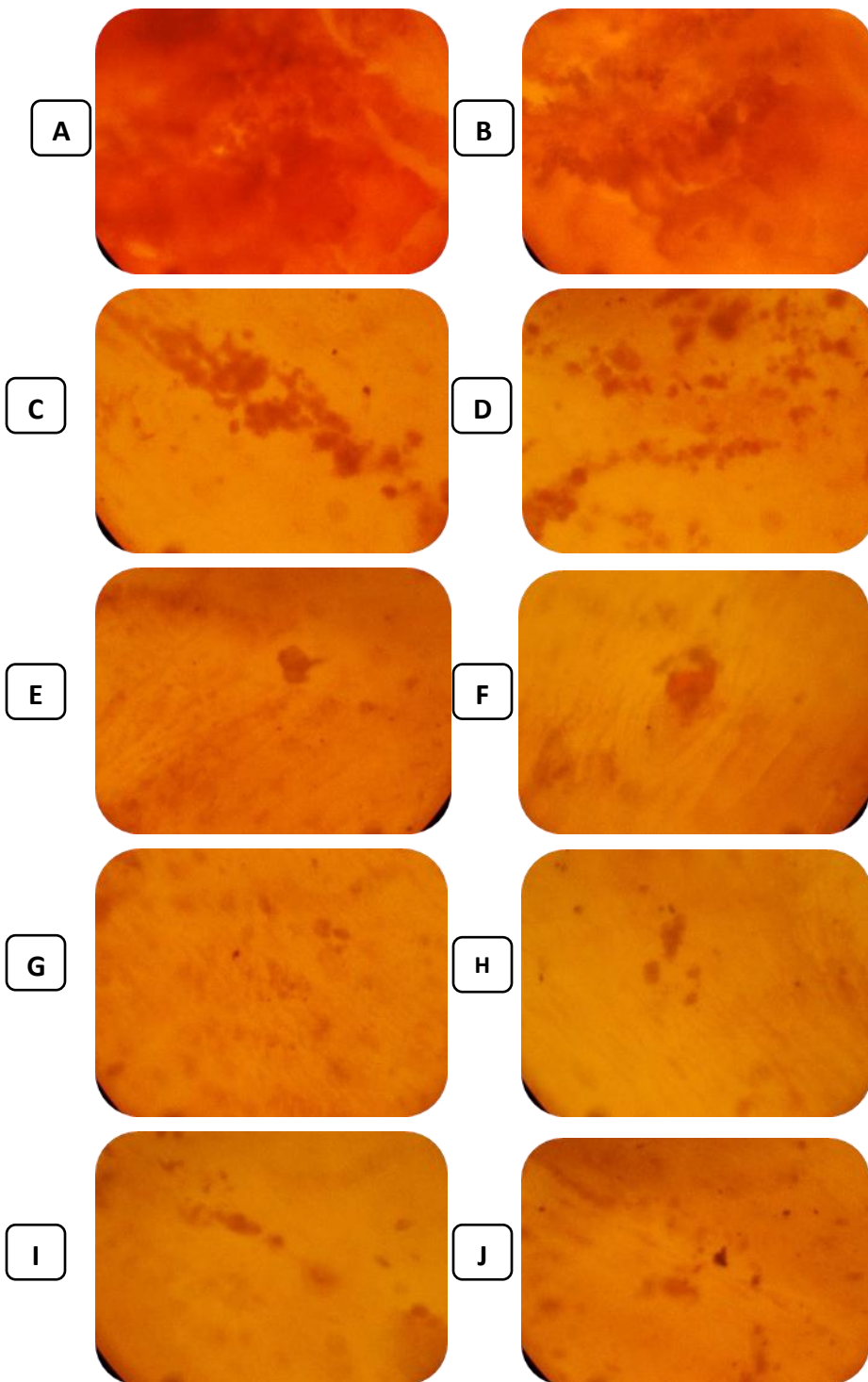


Figura 1. Láminas óseas representativas de células con tinción TRAP positivas, observadas en microscopio de luz (Vanguard®), 40X, **A, B** Grupo PEG; **C, D** Grupo F; **E, F**: Grupo PEG+NAC; **G,H**: Grupo F+NAC; **I,J**: Grupo (-fu, -F)

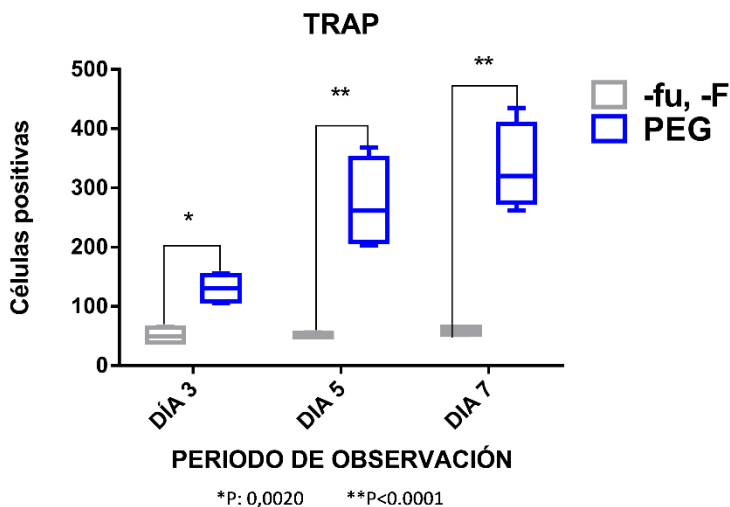


Tabla 2. Cantidad de células TRAP positivas observadas en el grupo tratados con fusión (PEG) evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo, en comparación con el grupo no sometido a fuerza ni a fusión (-fu, -F). Diferencia estadísticamente significativa al 3 día de cultivo con un valor de *P: 0.0020, y con un valor de **P<0.0001 al 5 y 7 día de cultivo.

Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de células TRAP positivas encontradas en los grupos F y PEG a los 3, 5 y 7 días. (tabla 3).

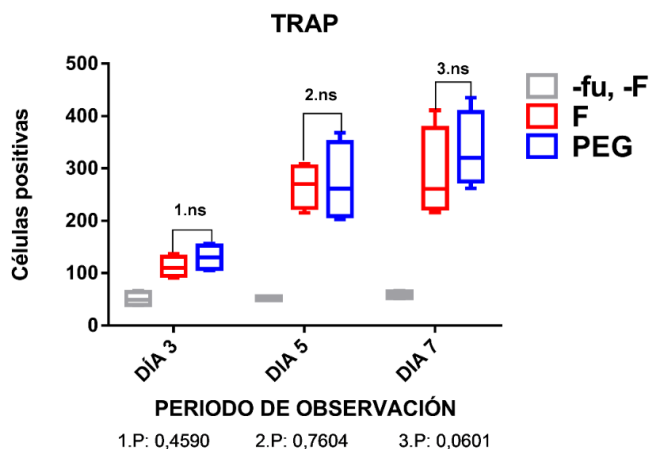


Tabla 3. Cantidad de células TRAP positivas, observadas en el grupo F en comparación con células TRAP positivas del grupo PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia NO estadísticamente significativa entre los grupos en los tres periodos de observación, con un valor de P: 0.04590 al 3 día, un valor de P: 0.7604 al 5 y un valor de P: 0.0601 al 7 día de cultivo.

Tanto en el grupo F como en el grupo PEG se observó un aumento significativo de células TRAP positivas al día 3 de cultivo comparándolo con el grupo -fu, -F; la cantidad de células TRAP positivas incrementó al día 5 y 7 de cultivo para ambos grupos. Al análisis estadístico se encontró una diferencia estadísticamente significativa comparando la cantidad de células TRAP positivas en los días 3 y 5 y entre los días 3 y 7, pero no entre los días 5 y 7, para ambos grupos (tablas 4 y 5).

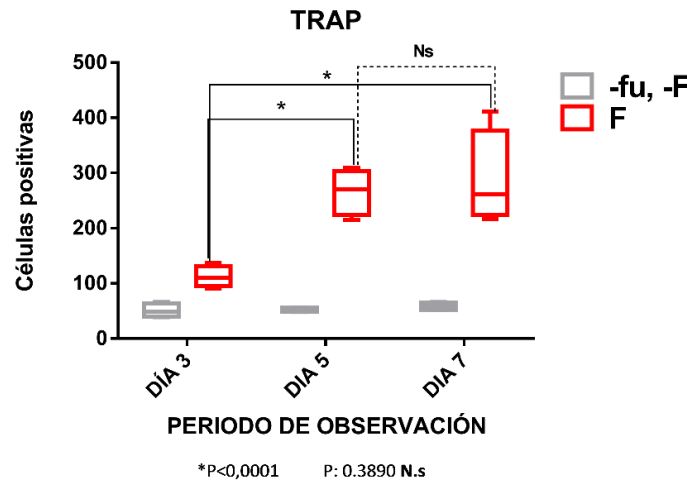


Tabla 4. Cantidad de células TRAP positivas, en los grupos F evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 - 5 y entre los días 3-7 con un valor de *P<0.0001 y una diferencia NO estadísticamente significativa entre los días 5 y 7 con un valor de P: 0.3890

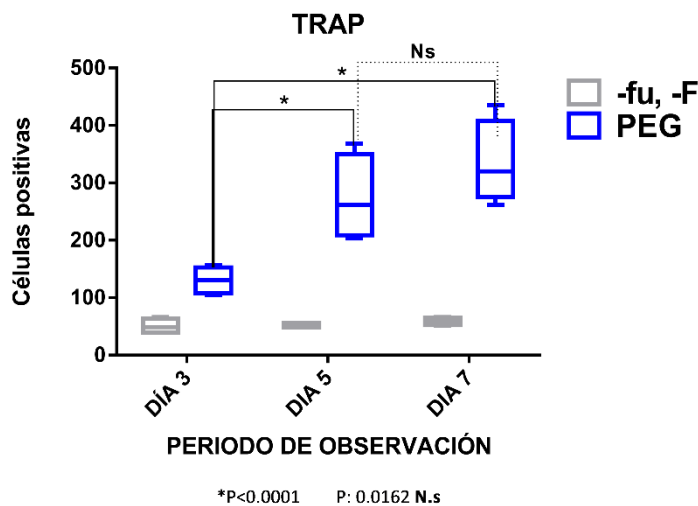


Tabla 5. Cantidad de células TRAP positivas, en los grupos PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 - 5 y entre los días 3-7 con un valor de *P<0.0001 y una diferencia NO estadísticamente significativa entre los días 5 y 7 con un valor de P: 0.0162

Los grupos que fueron tratados con NAC, (F+NAC) y (PEG+NAC), presentaron una evidente disminución del número de células TRAP positivas comparados con los grupos sin aplicación de NAC: F y PEG (tablas 6 y 7). Por otra parte, al comparar los grupos F+NAC y PEG+NAC con el grupo control negativo (-fu,-F) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células TRAP positivas (tablas 8 y 9)

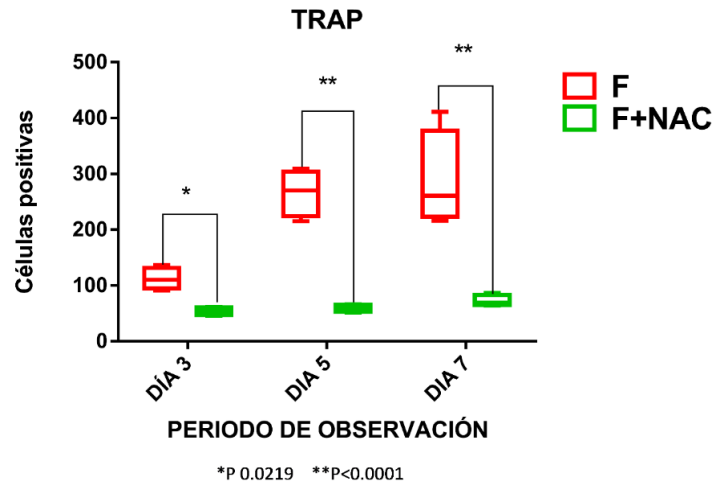


Tabla 6: cantidad de células TRAP positivas en los grupos tratados con fuerza F comparados con los grupos tratados de igual manera adicionándoles NAC (F+NAC) al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de células TRAP positivas en los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa con los grupos a los que no se trató con NAC

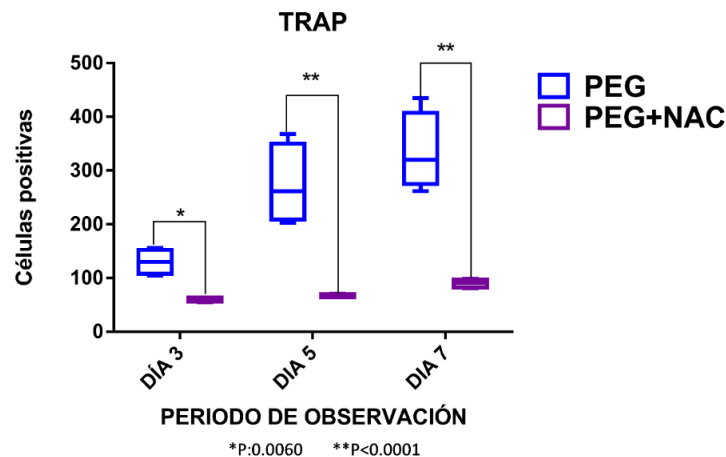


Tabla 7: cantidad de células TRAP positivas en los grupos fusionados con PEG comparados con los grupos tratados de igual manera adicionándoles NAC (PEG+NAC) al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de células TRAP positivas en los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa con los grupos a los que no se trató con NAC

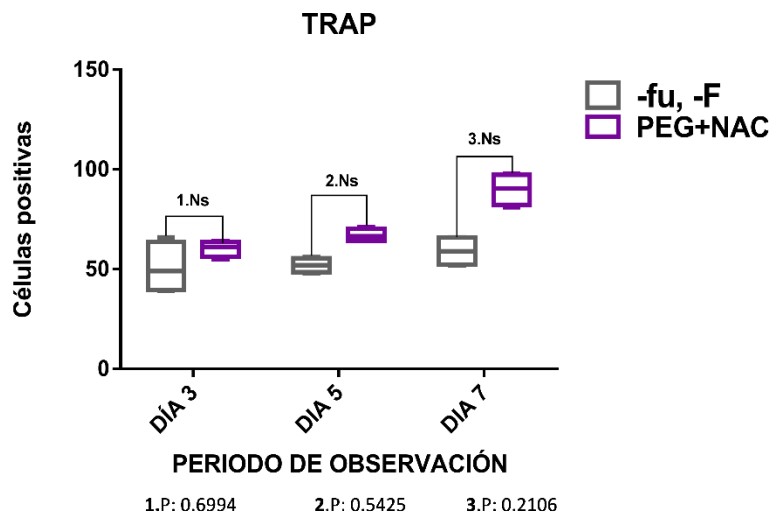


Tabla 8 : cantidad de células TRAP positivas en los grupos PEG+NAC, comparados con los grupos (-fu, -F) al 3, 5 y 7 día de cultivo. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ningún periodo evaluado.

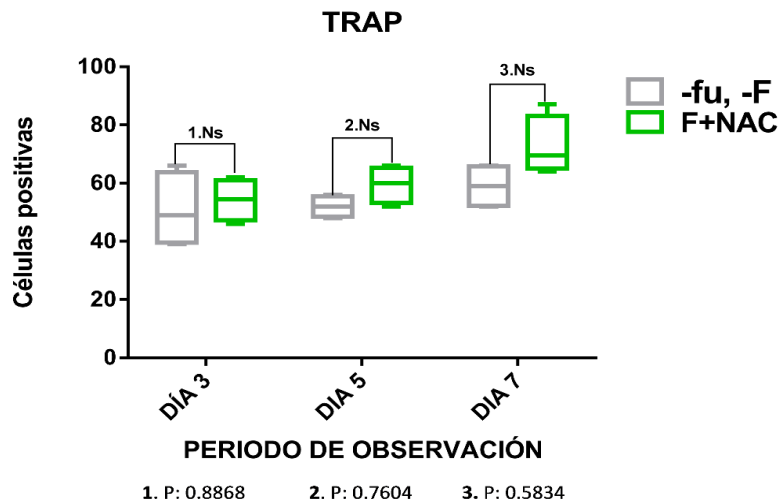


Tabla 9: cantidad de células TRAP positivas en los grupos F+NAC, comparados con los grupos (-fu, -F) al 3, 5 y 7 día de cultivo. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ningún periodo evaluado.

6.12 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD RESORTIVA AL 3, 5 Y 7 DIA DE CULTIVO

Una vez retiradas las células del hueso y teñidas con azul de Coomassie se procedió a observar al microscopio las lagunas de reabsorción formadas por estas en cada uno de los grupos evaluados.

Las láminas de hueso del grupo celular PEG mostraron un número elevado de lagunas de reabsorción, con un patrón de forma irregular sin bordes definidos; aunque las lagunas tenían tamaños variables, predominaron las de mayor tamaño y de gran profundidad fácilmente visibles durante el recorrido del hueso. (Imagen 2. A.B). Mientras que en el grupo de PEG +NAC se observaron pocas cantidades de lagunas de menor tamaño, igualmente amorfas (Imagen2 C.D)

Al evaluar las láminas de hueso del grupo celular F, se encontraron lagunas de reabsorción con bordes difusos, de menor tamaño y superficiales, en algunas láminas las lagunas se observaron agrupadas en forma de racimo y en otras láminas se encontraron aisladas (Imagen 2. E.F), en el grupo de F+NAC. Se encontraron lagunas en un número reducido, superficiales y aisladas (Imagen 2 G.H)

Realizando una comparación en el número de lagunas de reabsorción del grupo PEG y el grupo control negativo (-fu, -F), se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, siendo PEG el de mayor número, en cada uno de los días evaluados. (tabla 10), igualmente ocurrió en el grupo F, en donde el número de lagunas de reabsorción fue mayor comparándolo con el grupo control negativo (-fu, F), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa en los tres periodos de observación (tabla 11)

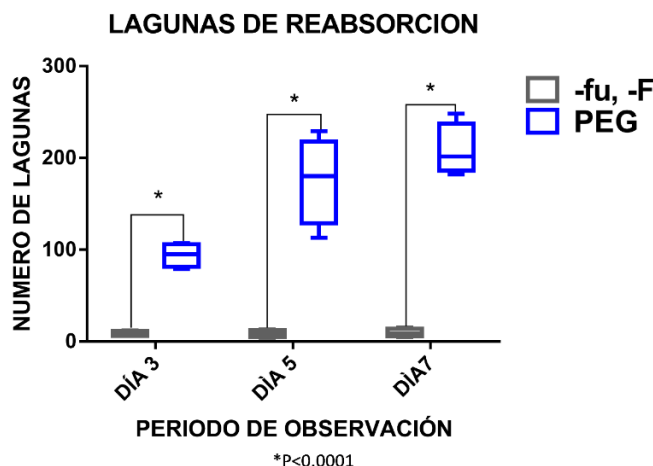


Tabla 10. Número de lagunas de reabsorción evaluadas en los grupos PEG al 3, 5 y 7 día comparándolo con los grupos no tratados con fuerza ni fusión (-fu, F). Diferencias estadísticamente significativas en los tres periodos de tiempo con valores de *p<0.0001

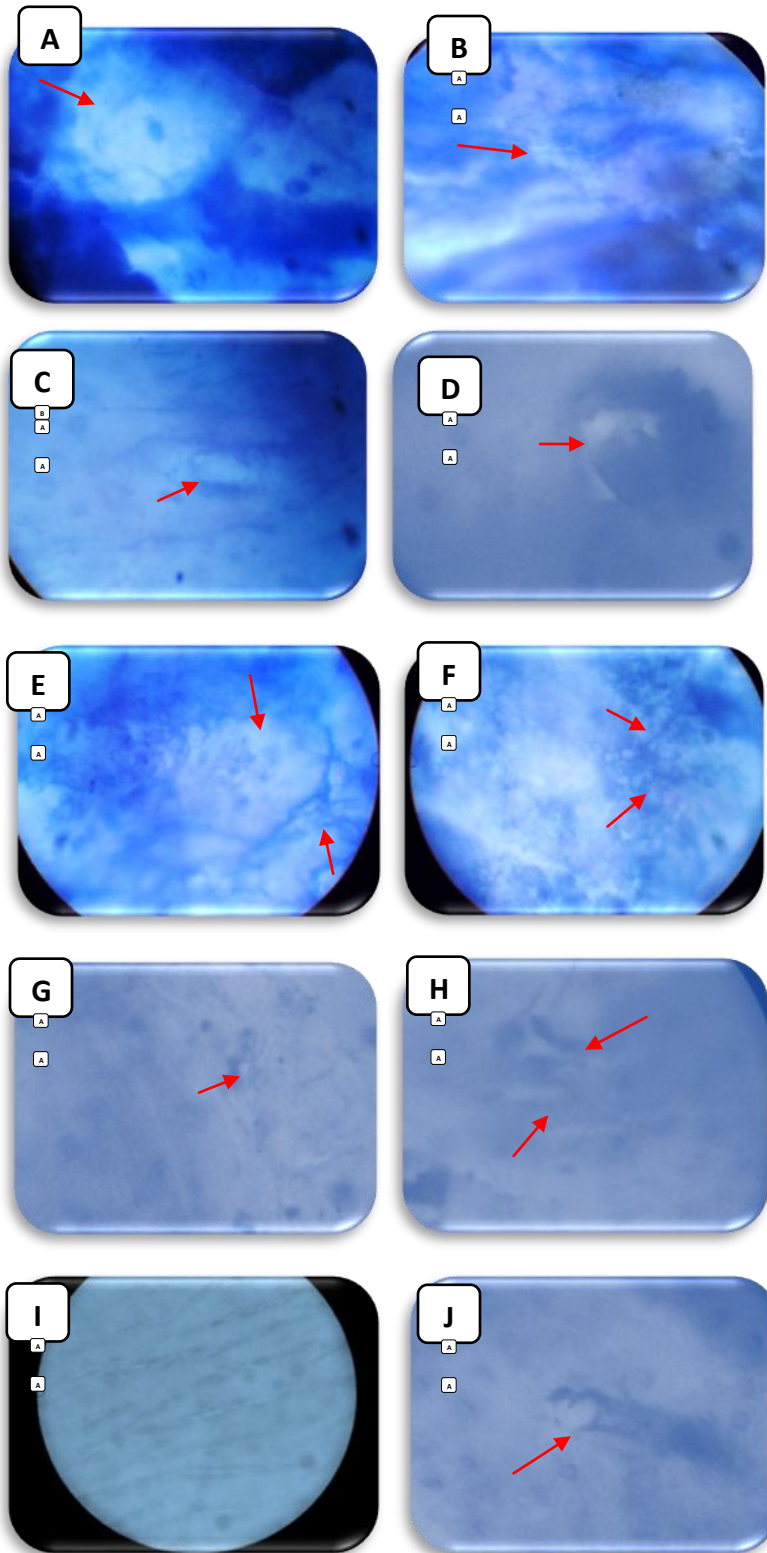


Imagen 2. Microfotografías representativas de lagunas de resorción tinción Coomasie. Observadas a microscopio de luz (Vanguard®) objetivo de 40x, fotografías con cámara Panasonic® DMC-FHS. **A, B** Grupo PEG; **C, D:** Grupo PEG+NAC, **E, F:** Grupo F; **G,H:** Grupo F+NAC, **I, J:** Grupo (-fu,-F)

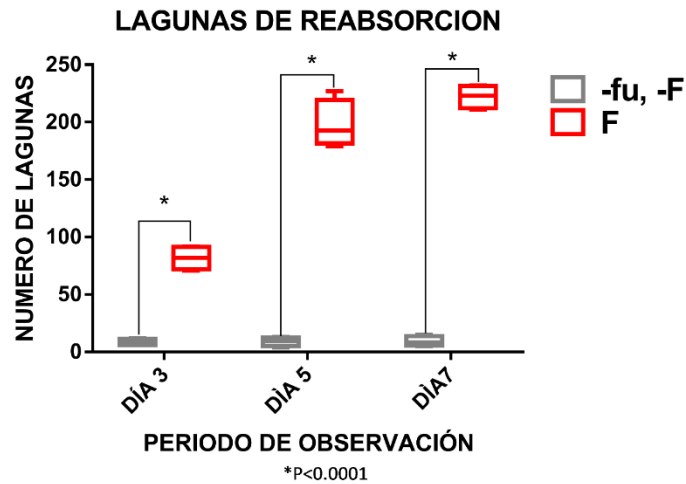


Tabla 11. Número de lagunas de reabsorción evaluadas en los grupos F al 3, 5 y 7 día en comparación con los grupos no tratados con fuerza ni fusión (-fu, -F). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los tres periodos de tiempo con valores de * $p < 0.0001$

Las láminas óseas del grupo PEG y del grupo F mostraron cantidades de lagunas de reabsorción similares, en donde la diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa en el 3 y 7 día de cultivo.(tabla 12)

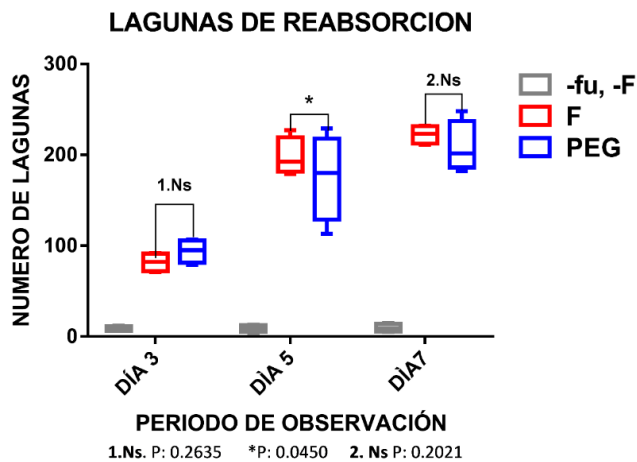


Tabla 12. Número de lagunas de reabsorción en los grupos sometidas a Fuerza (F) en comparación con los grupos tratadas con PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia NO estadísticamente significativa entre los grupos al 3 y 7 días de cultivo, con un valor de P: 0.2635 y 0.2021 respectivamente. En el día 5 de cultivo se presentó una diferencia significativa con un valor de P: 0.0450

Los grupo tratados con NAC: ((F+ NAC) y (PEG + NAC)) presentaron una disminución estadísticamente significativa en el número de lagunas de reabsorción en comparación con los grupos F y PEG, respectivamente (tabla 13 y 14)

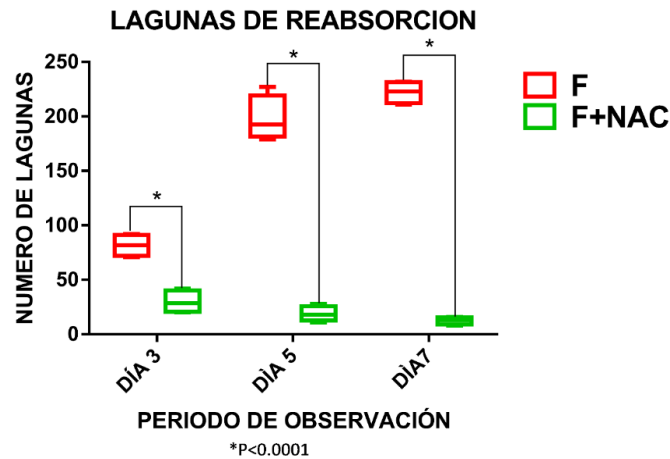


Tabla 13. Número de lagunas de reabsorción en los grupos sometidos a Fuerza F en comparación con los grupos F+NAC al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de lagunas de reabsorción en todos los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los tres periodos de tiempo

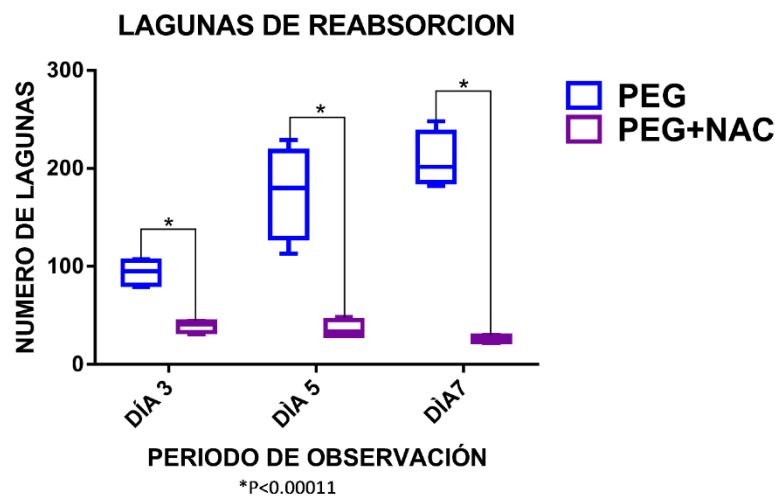


Tabla 14. Número de lagunas de reabsorción en los grupos de PEG en comparación con los grupos de PEG+NAC al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de lagunas de reabsorción en todos los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los tres periodos de tiempo

Las lagunas de reabsorción para el grupo F y PEG se presentaron a partir del 3 día de cultivo, el número se incrementó para los días 5 y 7 en ambos grupos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar el número de lagunas del 3 día con el 5 día, del 3 día con el 7 día y del 5 día con el 7 día, tanto para el grupo F como para el de PEG. (Tabla 15 y 16)

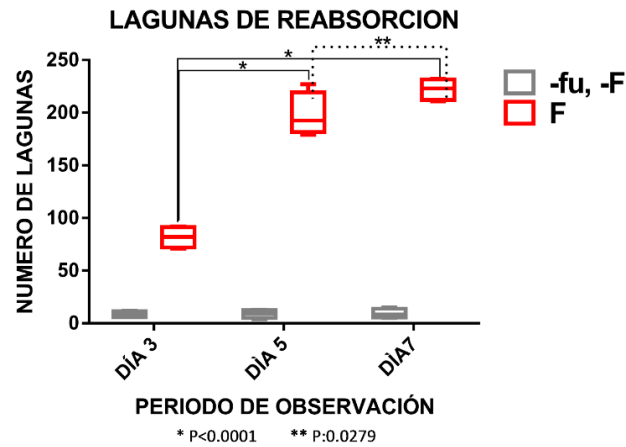


Tabla 15. Número de lagunas de reabsorción, en los grupos de células sometidas a fuerza (F) evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 – 5; 3-7 con un valor de *P<0.0001 y entre el día 5 y 7 con un valor de P: 0.0279

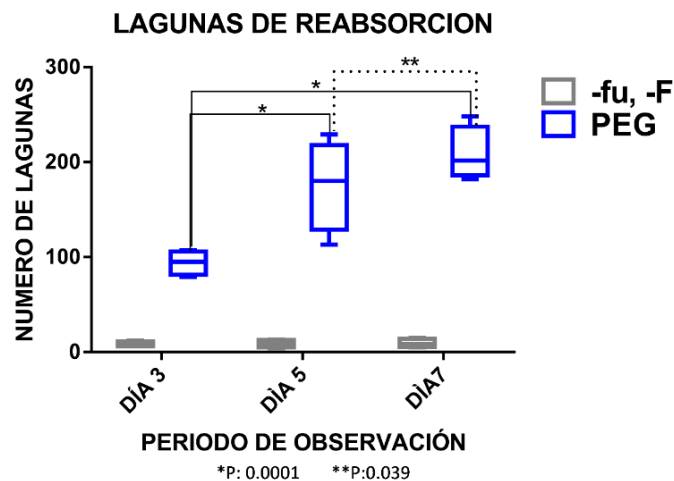


Tabla 16. Número de lagunas de reabsorción, en los grupos de células tratadas con PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 – 5; 3-7 con un valor de *P<0.0001 y entre los días 5-7 con un valor de P: 0.0039

6.13 EVALUACION DE LA EXPRESIÓN DEL MARCADOR OSTEOCLASTICO INTEGRINA B3 AL 3, 5 Y 7 DIA DE CULTIVO.

Durante la evaluación de los marcadores por inmunofluorescencia, se observó que el grupo tratado con fuerza presentó fluorescencia leve para el marcador de integrina β_3 . Las zonas fluorescentes se observaron de tamaño pequeño, asemejando células aisladas con forma irregular sin bordes definidos. Estas pequeñas masas se observaron en la periferia de la lámina ósea. (Imagen 3 A) El porcentaje de fluorescencia encontrado en el grupo de fuerza fue de 5%, 15% y 25% al 3, 5 y 7 días respectivamente, es decir que incremento con el tiempo. En los grupos control negativo (-fu, -F) y los tratados con NAC no se evidenció ningún tipo de fluorescencia en todo el recorrido de la lámina ósea para los tres periodos de tiempo evaluados. (Imagen 3. B.C)

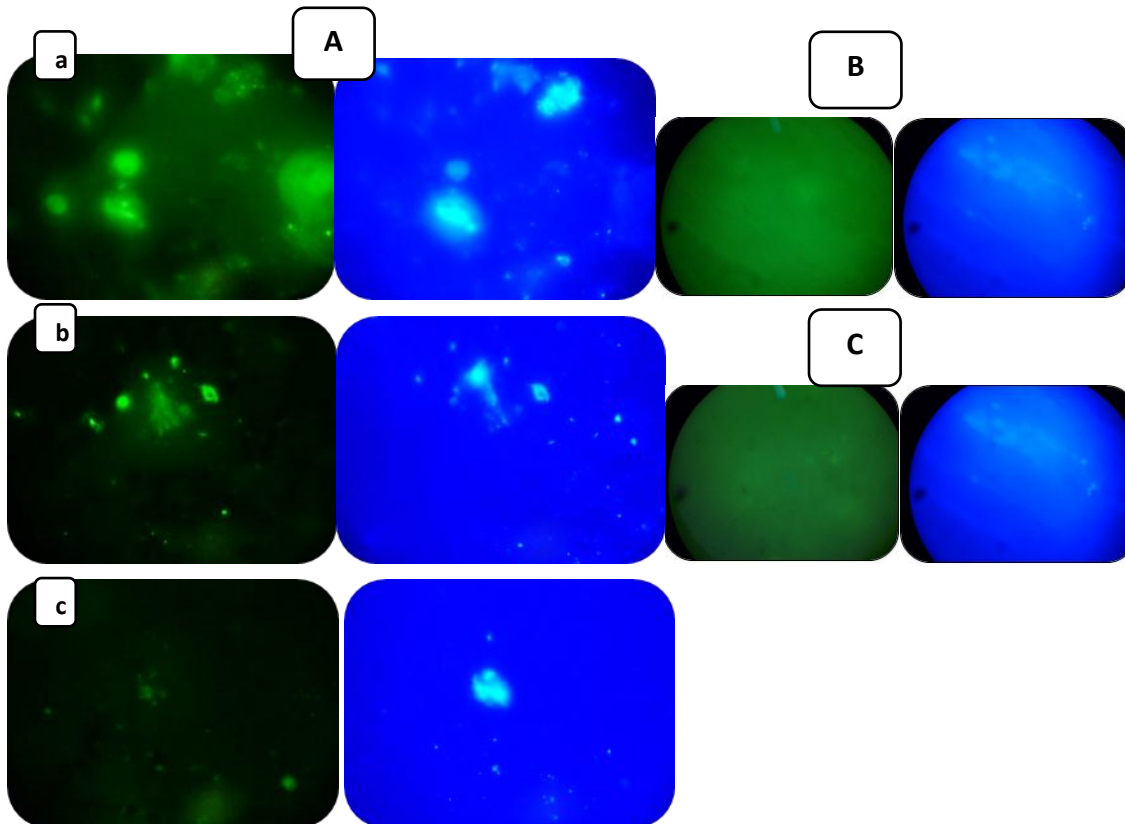


Imagen 3: Microfotografías representativas de inmunofluorescencia. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. y anticuerpo para integrina B3, evaluados al Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) observadas con objetivo de 100x, fotografías con cámara Panasonic®. DMC-FHS. **A.** Grupo F. **a:** 7 día de cultivo. **b:** 5 día de cultivo. **c:** 3 día de cultivo. **B** Grupo F+ NAC; **C** Grupo (-fu,-F)

7. DISCUSION

La resorción ósea desencadenada por los osteoclastos es crucial para generar un movimiento dental ortodóntico, Roberts (63) afirma que "la resorción ósea es el factor que limita la velocidad de movimiento de los dientes", por lo tanto, la velocidad a la que un diente se puede mover a través del hueso podría estar restringido principalmente por el número y la actividad de los osteoclastos. Basados en esto, la aparición de los osteoclastos se considera paso necesario e importante para que ocurra el movimiento dental; por esto es importante para los ortodoncistas entender el efecto de la fuerza en la activación de los osteoclastos

Los osteoclastos son grandes células gigantes multinucleadas que expresan actividad de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) y tienen la capacidad de formar cavidades de resorción en hueso y dentina. Estos osteoclastos se derivan a partir de progenitores hematopoyéticos del linaje de monocitos-macrófagos (64). En este experimento se utilizaron células mononucleares de sangre periférica CMNSP humanas que comprenden una población mixta de células mononucleares que contiene monocitos / macrófagos, precursores tempranos de los osteoclastos del linaje de monocitos, y linfocitos T y B. las CMNSP, no contienen células estromales o precursores de células del estroma. (65)

Las CMNSP fueron cultivadas con adición al cultivo de fitohemaglutinina, Estudios realizados in vivo e in vitro han mostrado que los procesos de diferenciación osteoclastogénica están asociados con un incremento y activación de la población de linfocitos T. Se ha encontrado que estas células producen citocinas como el RANKL, la interleucina -17, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (FSC-GM) y el interferón (IFN) gamma, que tienen efectos reguladores de gran alcance en la osteoclastogénesis.(66)(64)(67). Con esta premisa se han desarrollado modelos para la generación de osteoclastos utilizando CMNSP agregándoles fitohemaglutinina(PHA) lo que estimula la proliferación de linfocitos T, logrando obtener osteoclastos a partir de monocitos.(65)(68). Además se ha reportado que la presencia del marcador CD13 y CD14 en las CMNSP estimuladas con PHA, sugiere que existen poblaciones reportadas como precursores in vitro de células similares a osteoclastos, como son las células mielomonocito/dendríticas y los monocitos CD14.(69).

Los efectos del estímulo con PHA en la resorción han sido descritos en osteoclastos extraídos de huesos de ratones adultos, en donde un incremento en el número de estas células y de su actividad resorptiva, ha sido asociado a la presencia de la PHA(70). Lo anterior podría explicar porque algunas CMNSP no fusionadas utilizadas como el control negativo presentaron positividad en el análisis de la enzima TRAP, ya que estas fueron estimuladas con PHA por 72 horas. De igual manera la presencia de la PHA, ayudaría a incrementar y mantener la función resorptiva de las CMNSP en el tiempo.

Los datos obtenidos durante el experimento muestran que las CMNSP obtenidas a partir de la fusión con PEG y luego de someterlas a fuerza expresaron la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) y fueron capaces de formar lagunas de reabsorción en las láminas óseas donde estuvieron cultivadas por 3, 5 y 7 días.

En la evaluación de la expresión de la enzima TRAP y la reabsorción ósea, las células pertenecientes al grupo PEG, se observaron como grandes agrupaciones celulares, con una coloración en su mayoría intensa que varió de rojo ladrillo a café, característica de células TRAP positivas, además las láminas óseas en donde fueron sembradas presentaron grandes y profundas lagunas de reabsorción. Estos resultados son similares a los descritos por anteriores estudios donde se sugiere que el tratamiento de CMNSP con PEG puede inducir la formación de células multinucleares y la reabsorción ósea (68) (8) (71), igualmente, el tratamiento de monocitos de la línea tumoral U937/A y J/774 (7) y de fibroblastos humanos (6) con PEG promueve la formación de células con actividad TRAP positiva y la reabsorción ósea. Basados en estos resultados, se sugiere que PEG induce fusión celular eficientemente produciendo una célula multinucleada, con actividad similar a los osteoclastos debido a sus dos funciones importantes como son la de agregar las células, cuando extrae el agua entre las membranas y la de aumentar la fuerza osmótica, generando la fusión de las membranas celulares. (72). Estos resultados igualmente son concordantes con otros estudios donde las CMNSP son estimuladas con factores osteoclastogénicos o calcitrópicos para diferenciarlas en células similares a osteoclastos(66)(73)(74). Sin embargo en nuestro estudio obtuvimos células resortivas sin necesidad de estos factores demostrando un modelo fácil de reproducir y más económico para el estudio del proceso de reabsorción.

En el experimento se determinó que la actividad resortiva del grupo de células PEG fue mayor al 7 día de observación concordando con los resultados de Castillo y col. (68) donde se cultivaron las CMNSP por 14 días concluyendo que al día 7 se presentó un alto porcentaje de áreas resortivas la cual se mantuvo constante, sin un aumento representativo hasta los 14 días.

En el estudio realizado, Las CMNSP humanas responden ante fuerzas mecánicas activándose en células similares a osteoclastos, siendo TRAP positivas, con capacidad de reabsorción. En los resultados de la evaluación de la enzima TRAP estas células se observaron de menor tamaño que las observadas en el grupo PEG agrupadas pero no fusionadas y localizadas en su mayoría en la periferia. Este grupo de células formaron lagunas de reabsorción igualmente pequeñas y superficiales, estos resultados son similares a los encontrados en anteriores estudios donde se utilizaron CMNSP(8) y fibroblastos humanos(6), ambos con métodos similares a los utilizados en el presente estudio.

A este respecto, múltiples autores han reportado que diferentes sistemas que involucran factores mecánicos han sido utilizados para lograr la diferenciación de osteoclastos. Sin embargo dependiendo de la naturaleza y magnitud de la fuerza se activan señales que pueden o no, apoyar el proceso de osteoclastogénesis.

Kanzaki H. et al(75) refieren que las fuerzas compresivas aplicadas sobre fibroblastos del ligamento periodontal (LP) promueven la producción de citoquinas inflamatorias lo que aumenta la expresión de RANKL sobre estas células que cultivadas con precursores osteoclásticos como CMNPS permiten la diferenciación osteoclastogénica. Igualmente Nakao y col(76) reportan que una fuerza de compresión óptima e intermitente y no continua aplicada sobre un cultivo de fibroblastos del LP promueve la expresión de IL-1, esta señal aumenta la expresión de RANKL, induciendo directamente la osteoclastogénesis en precursores osteoclásticos. Ichimiy H. et al. (77) reportaron que la compresión mecánica estática, aplicada sobre células sinoviales promueve la formación de osteoclastos a través de la expresión de RANKL, luego de que estas células se cultivaran con células de médula de ratón en presencia del factor estimulante de colonia (FSC-M). Por otra parte, estos mismos autores reportan que la tensión mecánica no apoyaba la osteoclastogénesis, esta premisa es afirmada por otras investigaciones en las que refieren que la aplicación de fuerzas tensiles inhiben la formación de osteoclastos por la disminución de la expresión de RANKL en células estromales de la médula(78)(79).

También se ha reportado que fuerzas centrífugas estimulan la producción de osteoprotegerina (OPG) en fibroblastos gingivales lo cual igualmente inhibe la formación de células similares a osteoclastos, pero en este mismo estudio se encontró que fibroblastos del ligamento periodontal, si lograron inducir un gran número de células multinucleadas TRAP positivas en co-cultivo con células de médula ósea de ratón, en presencia de Dexametasona y vitamina D, causando niveles elevados de RANKL por parte de los fibroblastos(80).

Todos los estudios mencionados previamente fueron realizados mediante co-cultivos de células que expresan RANKL (como fibroblastos de LP y células estromales) con precursores osteoclásticos acompañados generalmente de algún estímulo externo como FSC-M, RANKL, Vitamina D3, dexametasona, entre otros de tal forma que no se establece si es la fuerza la que genera directamente la sobreexpresión de RANKL o son las citoquinas agregadas en los cultivos. Con este estudio proponemos un nuevo modelo de generación de células con actividad osteoclástica debido a que no se utilizó ningún agente externo y tampoco se generó un cocultivo, es decir que la fuerza que actuó directamente sobre las CMNSP logró diferenciarlas hacia células con actividad resorptiva.

Un hallazgo importante en el experimento es que se determinó que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en el número de células TRAP positivas y en el número de lagunas de reabsorción entre los grupos tratados con fuerza en comparación con los grupos tratados con PEG. Esto nos sugiere que la aplicación de la fuerza puede ser tan eficiente en la diferenciación de células osteoclásticas como lo es en la fusión con PEG.

Xu y col(81) Realizaron un estudio donde se aplicaron diferentes magnitudes de tensión a células RAW264.7 tratadas con FSC-M y RANKL. Los investigadores encontraron que fuerzas tensionales de baja magnitud suprimen la fusión y activación de osteoclastos, mientras que fuerzas tensionales de alta magnitud (2.000 y 2.500 $\mu\epsilon$) aplicadas dentro de la carga fisiológica promueve la fusión y activación de los osteoclastos, relacionando la expresión de RANK con una respuesta mecánica dependiente de la magnitud. Hiroyuki y col (75) reportan que ante el estímulo de una fuerza compresiva aplicada sobre células del LP en cocultivo con CMNSP, el número de células TRAP positivas se maximiza con cargas más pesadas y de mayor duración (2 g / cm² y 24 h), Ichimiya(77) también concluyo que fuerzas compresivas de 2g/cm² aplicadas por 12 horas a un cocultivo de células sinoviales con células de médula ósea de ratones, promovió la formación d células osteoclásticas en comparación con una fuerza compresiva de 1g/cm².

Nakao y col(76) examinan el mecanismo molecular de células del LP humanas luego de aplicar un fuerza continua e intermitentes de 2g/cm² y 5 g/cm² concluyendo que hay un aumento de la expresión del RANKL al aplicar una fuerza intermitente en comparación con una fuerza continua para ambas magnitudes de fuerza. Basado en lo anterior, se podría concluir que la magnitud de la fuerza tiene gran influencia en la activación de los osteoclastos. En este estudio se aplicó una fuerza de 5g/cm² la cual fue óptima para obtener células TRAP positivas y con actividad resortiva. En la mecanoterapia ortodóntica se estima que fuerzas ligeras que no exceden la presión sanguínea capilar de 20 a 25 g / cm² son adecuadas para que el movimiento dental ocurra (82)

Durante la aplicación de una fuerza mecánica ortodóntica sobre el LP, se produce una liberación de diferentes citoquinas, entre las que se encuentra el RANKL inductor importante para el proceso de osteoclastogénesis(82). El tiempo óptimo luego de aplicar una fuerza ha sido evaluado con el fin de conocer el rango de tiempo donde es posible la activación celular osteoclástica necesaria para que ocurra el movimiento dental. Roberts y Ferguson(63) encontraron que el número de osteoclastos por unidad de área de superficie de hueso muestran un nivel de pico de 50 horas (aproximadamente 2 días después de la aplicación de la fuerza de ortodóntica). Gaoman y col(83) realizan un estudio en un modelo animal de ratón donde aplican una fuerza mecánica sobre los molares y refieren que los osteoclastos demoran en aparecer entre 3 y 5 días luego de la aplicación del estímulo. Igualmente Rody y col(84) aplicaron una fuerza ortodóntica sobre molares de ratones y analizaron el sitio de compresión, donde se observó un número significativo de preosteoclastos en el ligamento periodontal y en la superficie del hueso en el 3 día.

Estos estudios apoyan los resultados obtenidos en esta investigación donde se encontró que a partir del tercer día de aplicación de la fuerza se obtuvieron células TRAP positivas y capaces de formar lagunas de reabsorción sobre el hueso donde fueron sembradas. Además se encontró que el número de células TRAP positivas

en el grupo F incremento de manera significativa hasta el día 5($p < 0.0001$), pero a partir de este día hasta el día 7 no hubo un aumento estadísticamente significativo ($p: 0.3890$)

En los grupos que se añadió NAC (F+NAC; PEG+NAC) se evidencio una disminución tanto del número de células TRAP positivas como del número de lagunas de reabsorción para los tres periodos de tiempo evaluados (3, 5 y 7 día). Por lo que podemos concluir que el agente oxidante NAC, es un potente inhibidor de las actividades relacionadas con células resorptivas.

Se ha reportado que en cultivos celulares de sangre periférica en presencia de RANKL se obtienen células similares a osteoclastos acompañadas con una producción de ROS. Cuando se aplica al cultivo celular NAC se inhibe la respuesta de las células al RANKL, e inhibe la producción de ROS, impidiendo la diferenciación de osteoclastos.(55)

Toker, H. y col(59) reportan que la administración sistémica de NAC en un modelo experimental de periodontitis en ratas previene la pérdida de hueso alveolar. Esto se explica porque durante el proceso inflamatorio, NAC disminuye la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por lipopolisacáridos (IL-1b, IL-6 y IL-8) en células fagocíticas y fibroblastos gingivales; como resultado directo de estas acciones

La NAC actúa como mucolítico, secretolítico y fluidificante de las secreciones. Es de venta libre y es utilizada en personas de todas las edades. NAC tiene valor terapéutico para la reducción de la disfunción endotelial, inflamación, fibrosis, invasión, la erosión del cartílago, la desintoxicación del fármaco acetaminofén y prolongación de trasplantes. (85)

Debido a que NAC suprime la diferenciación de los osteoclastos, este antioxidante puede conducir a la prevención de la resorción ósea, en ortodoncia podría ser utilizado como un agente para evitar la recidiva del tratamiento ortodóntico y apoyando el periodo de retención.

8. CONCLUSIONES

1. El grupo de células fusionadas con PEG presentaron marcadores de osteoclastos activos, por lo cual podemos validar este modelo para el estudio de la reabsorción
2. La acción de la fuerza sobre CMNSP generó una diferenciación positiva de las células hacia el linaje osteoclástico
3. A partir del tercer día de aplicación de fuerzas sobre el cultivo hubo diferenciación de células hacia el linaje osteoclástico
4. Existe una mayor diferenciación de células hacia el linaje osteoclástico al 7 día de aplicación de fuerza que al tercer día
5. NAC presenta la capacidad de inhibir la diferenciación de células hacia el linaje osteoclástico

9. RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones in vitro con células derivadas de sangre periférica, realizar estudios de aplicación de fuerza con diferentes magnitudes y evaluar su comportamiento.

Realizar estudios enfocados en el mecanismo de acción del NAC, valorando ROS y de esta manera contribuir al control de la recidiva en ortodoncia.

Se recomienda ser muy cuidadoso en la preparación de las láminas de hueso, ya que a menor volumen y más planas, eran más fácil de enfocar el objetivo en el microscopio, de esta manera se pueden obtener mejores registros..

Se podría emplear la evaluación de la expresión de RANKL en los grupos sometidos a fuerza para aclarar el modo en que esta actúa sobre las células para su diferenciación hacia el linaje osteoclástico.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Grigoriadis AE, Kennedy M, Bozec A, Brunton F, Stenbeck G, Park IH, et al. Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells *Blood*. 2010;(115):2769-76
2. Sun HH, Chen B, Zhu QL, Kong H, Li QH, Gao LN, et al. investigation of dental pulp stem cell isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials*. 2014;(35):9459-72
3. Kim AD, Stachura DL, Traver D. Cell signaling pathways involved in hematopoietic stem cell specification. *Exp Cell Res*. 2014; (329):227-33.
4. Lerner U.H, Osteoblasts, Osteoclasts, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. *Seminars in Orthodontics*.2012; (18):237–248.
5. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res* 2001 ;(80):887–91.
6. Pazos Valencia LB. Análisis de la actividad resorptiva de células fibroblastoides (cultivo primario gingival) luego de someterlas a fuerza tensil o fusionarlas con PEG. Bogotá, 2013. Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de odontología.
7. Murillo A, Guerrero CA, Acosta O, Cardozo CA. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol. Res*. 2010;(43):205-24
8. Bedoya S. Evaluación de la actividad resorptiva de CMNSP fusionadas con polietilenglicol (PEG), tratadas con fuerza centrífuga y con N acetilcisteina (NAC). Bogotá, 2015. Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de odontología

9. Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontics tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001; (120):466-76.
10. Ren Y, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Immunohistochemical evaluation of osteoclast recruitment during experimental tooth movement in young and adult rats. *Arch Oral Biol.* 2005; (50):1032-9.
11. Matsuzaki K, Udagawa N, Tamaguchi K, Yasuda H, Shima N, Morinaga T, Yabe Y, Higashiro K, Suda T. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclastlike cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 ;(246):199-204.
12. A. D. Kim; D. L. Stachura; D. Traver. Cell signaling pathways involved in hematopoietic stem cell specification. *Exp Cell Res.* 2014; (329):227-33
13. Zimmermann S, Martens UM. Telomeres, senescence, and hematopoietic stem cells. *Cell Tissue Res.* 2008; (331):79-90.
14. A. D. Kim; D. L. Stachura; D. Traver. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell aging. *Exp Cell Res.* 2014; (329):192–199.
15. Mayani, H., et al. Hematopoiesis. *Cancerología,* 2007; (2):95-107.
16. Xiao Y, Zijl S, Wang L, de Groot DC, van Tol MJ, Lankester AC, et al. Identification of the Common Origins of Osteoclasts, Macrophages, and Dendritic Cells in Human Hematopoiesis. *Stem cell reports,* 2015; (4): 984-994
17. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood,* 1993; (81): 2844-2853
18. Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol* 2004; (25): 645-649
19. Pelayo R, Welner RS, Nagai Y, Kincade PW. Life before the Pre-BCR checkpoint: specification and commitment of primitive lymphoid progenitors in adult bone marrow. *Semin. Immunol* 2006; (18): 2-11

20. Holzapfel BM, Hutmacher DW, Nowlan B, Barbier V, Thibaudeau L, Theodoropoulos C. et al. Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis in vivo. *Biomaterials*. 2015 ;(61): 103-114.
21. Ohishi K, Katayama N, Shiku H, Varnum-Finney B, Bernstein ID. Notch signalling in hematopoiesis. *Semin Cell Dev Biol*. 2003; (14):143-150.
22. Perry SS, Welner RS, Kouro T, Kincade PW, Sun XH. Primitive lymphoid progenitors in bone marrow with T lineage reconstituting potential. *J Immunol* 2006; (177): 2880-288
23. Sakiyama H, Masuda R, Inoue N, Yamamoto K, Kuriwa K, Nakagawa K, Yoshida K. Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers. *J Bone Miner Metab*. 2001; (19) :220–7.
24. Peruzzi B; Teti A. The Physiology and Pathophysiology of the Osteoclast. *J. Clinic Rev Bone Miner Metab*. 2012; (10): 71-97
25. Soysa NS, Alles N, Aoki K, Ohya K. Osteoclast formation and differentiation: an overview. *J Med Dent Sci*. 2012; (59): 65-74
26. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Mol Med Rep* (2015), (11) 3212-3218.
27. Zou W¹, Reeve JL, Liu Y, Teitelbaum SL, Ross FP. DAP12 couples c-Fms activation to the osteoclast cytoskeleton by recruitment of Syk. *Mol Cell*. 2008; (31): 422-431.
28. Zhuo Y, Gauthier JY, Black WC, Percival MD, Duong LT. Inhibition of bone resorption by the cathepsin K inhibitor odanacatib is fully reversible. *Bone*. 2014, (67): 269-280.
29. Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008; (41): 218-223.

30. Hayman AR, Macary P, Lehner PJ, Cox TM. Tartrate resistant acid phosphatase (Acp 5): Identification in diverse human tissues and dendritic cells. *J Histochem Cytochem* 2001; (49) :675–683
31. Hayman AR, Bune AJ, Cox TM. Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo. *J Anat* 2000; (196) :433–441.
32. Hayman AR. Purification and characterization of a Tartrate-Resistant Acid Phosphatase from human osteoclastomas. *Biochem. J.* 1989; (261): 601-609.
33. Bartholin L, Destaing O, Forissier S, Martel S, Maguer-Satta V, Jurdic P. et al. FLRG, a new ADAM12-associated protein, modulates osteoclast differentiation. *Biol Cell.* 2005; (97): 577-588.
34. Yi H, Gruszczynska-Biegala J, Wood D, Zhao Z, Zolkiewska A. Cooperation of the metalloprotease, disintegrin, and cysteine-rich domains of ADAM12 during inhibition of myogenic differentiation. *J Biol Chem.* 2005; (280): 23475-23483.
35. Gu, J. H., Tong, X. S., Chen, G. H., Liu, X. Z., Bian, J. C., Yuan, Y. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 protein expression by $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ during osteoclast differentiation. *J Vet Sci.* 2014; (15): 133-140.
36. de Vrieze E, Sharif F, Metz JR, Flik G, Richardson MK. Matrix metalloproteinases in osteoclasts of ontogenetic and regenerating zebrafish scales. *Bone.* 2011;(48):704-712.
37. Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, et al. Receptor activator of NF- κ B ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264. 7 cells. *Life Sci.* 2007;(80):1311-8
38. Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaissé JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone.* 2004; (35): 1107-1119.
39. Kim T, Ha HI, Kim N, Yi O, Lee SH, Choi Y. Adrm1 interacts with Atp6v0d2 and regulates osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; (390):585-90

40. Xu J, Cheng T, Feng HT, Pavlos NJ, Zheng MH. Structure and function of V-ATPases in osteoclasts: potential therapeutic targets for the treatment of osteolysis. *Histol Histopathol.* 2007;(4):443-54.
41. Zhang, Chengcheng, et al. "DC-STAMP, the Key Fusion-Mediating Molecule in Osteoclastogenesis." *Journal of cellular physiology* 229.10 (2014): 1330-1335.
42. Chiu YH, Mensah KA, Schwarz EM, 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; (1):79-92.
43. Duong, L. T., & Rodan, G. A. Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Front Biosci.* 1998; (3):d757-68
44. Tian J, Qi W, Zhang Y, Glogauer M, Wang Y, Lai Z. et al. Bioaggregate Inhibits Osteoclast Differentiation, Fusion, and Bone Resorption in Vitro. *J Endod.* 2015 (41):1500-6
45. Kleinhans C, Schmid FF, Schmid FV, Kluger PJ. Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D. *J Biotechnol.* 2015 Jul 10;205:101-10
46. Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; (57):959-71
47. Hemmi H; Okuyama H; Yamane T; S.H. Nishikawa; Nakano T; Yamazaki T; Kunisada T; S.H Hayashi. Temporal and Spatial Localization of Osteoclasts in Colonies from Embryonic Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; (280):526-34.
48. A.E. Grigoriadis; M. Kennedy; A. Bozec; G. Stenbeck; E.F. Wagner; G. Keller. Directed differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to functional osteoclasts. *J. Bone.* 2009 (44):216.
49. Okuyama H; Tsunet M; Yamane T; Yamazaki H; Hayashi S. H. Discrete Types of Osteoclast Precursors Can Be Generated from Embryonic Stem Cells. *J stem cells.* 2003, (21): 670–680.
50. Yamane T, Kunisada T, Yamazaki H, Era T, Nakano T, Hayashi SI.. Development of Osteoclasts From Embryonic Stem Cells Through a Pathway That Is c-fms but not c-kit Dependent. *Blood.* 1997; (90):3516-23.

51. Lentz BR. Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events. *Chem Phys Lipids*. 1994 ; (73):91-106.
52. Lentz BR, Lee J. Poly (ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? (Review). *Mol Membr Biol*. 1999 (16):279-96
53. Lentz BR. PEG as a tool to gain insight into membrane fusion. *Eur Biophys J*. 2007; (36):315-26.
54. Toker H, Ozdemir H, Balcı H, Ozer H. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2012 ;(47):793-9
55. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*. 2003; (60):6-20
56. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS. et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*. 2005; (106): 852-859.
57. Chen JR, Lazarenko OP, Shankar K, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJ.. A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *J Bone Miner Res*. 2010 ;(25):1117-27
58. Cao JJ, Picklo MJ. N-acetylcysteine supplementation decreases osteoclast differentiation and increases bone mass in mice fed a high-fat diet. *J Nutr*. 2014; (144):289-96
59. Toker H, Ozdemir H, Balcı H, Ozer H. N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Periodontal Res*. 2012; (47):793-9
60. Chen JR, Shankar K, Nagarajan S, Badger TM, Ronis MJ.. Protective effects of estradiol on ethanol-induced bone loss involve inhibition of reactive oxygen species generation in osteoblasts and downstream activation of the extracellular signal-regulated kinase/signal transducer and activator of transcription 3/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand signaling cascade. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; (324):50-9.

61. Redlich M¹, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Bar Kana I, et al. The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and β -actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2004; (39):27-32.
62. The university Nottingham. [homepage en Internet]. United Kingdom; university Nottingham; c2014 [actualizada 19 Noviembre 2014; consultado 21 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.nottingham.ac.uk/>
63. Roberts WE, Jee WS. Cell kinetics of orthodontically-stimulated and non-stimulated periodontal ligament in the rat. *Arch Oral Biol.* 1974;(19):17-21.
64. Udagawa, N., Kotake, S., Kamatani, N., Takahashi, N., Suda, T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002; (4): 281-289.
65. Weitzmann, M.N., Cenci, S., Rifas, I., Haug, J., Dipersio, J., and Pacifici, R. T Cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor κ B ligand-dependent and independent mechanisms. *J. Bone Miner. Res.* 2001;(16): 328-337.
66. Yuasa K, Mori K, Ishikawa H, Sudo A, Uchida A, Ito Y. Characterization of two types of osteoclasts from human peripheral blood monocytes. *Bioch. Bioph. Res. Commu.* 2007; (356): 354-360.
67. Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab.* 2003;(21):337-43.
68. Castillo Im. Evaluación de la expresión y fosforilación de c src, syk y el arreglo de actina asociados con la actividad resortiva de cmnsp fusionadas con polietilenglicol. Bogota 2010. Tesis Facultad de Medicina. Universidad Nacional.
69. Alnaeeli, M. Penninger, J, .M., Yen-Tung, A,.T. Immune interactions with CD4+ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c dendritic cells. *J. Immunology.* 2006; (177): 3314-3326.
70. Wang, TM., Jee, WS., Woodbury, LA., and Matthews, JL. Effects of phytohemagglutinin-P (PHA-P) on bone of the growing rat. *Metab. Bone. Dis. Relat. Res.* 1982; (4):193-199
71. Manrique E. G. Evaluación del efecto de fármacos antirresortivos en el fenotipo y actividad resortiva de células mononucleares de sangre periférica humanas

- fusionadas con polietilenglicol. Bogotá 2007. Tesis para obtener el título de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Nacional
72. Monck, J.R., and Fernandez, J.M. The fusion pore and mechanisms of biological membrane fusion. *Current Opin. Cell. Biol.* 1996; (8):524-533.
 73. Young-Yun, K. et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *J. Cell Biochem.* 1999; (72): 67-80
 74. Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, Cameron PU, Holloway WR, Gough TJ,. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL). *Clin. Sci.* 2000; (99): 133–140.
 75. Kanzaki H, Chiba M, Sato A, Miyagawa A, Arai K, Nukatsuka S, et al. Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Stress Induce Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand Up-Regulation via Prostaglandin E2 Synthesis. *J Dent Res.* 2006; (85):457-62.
 76. Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J. Dent Res* 2007; (86): 623-628.
 77. Ichimiya H¹, Takahashi T, Ariyoshi W, Takano H, Matayoshi T, Nishihara T. Compressive mechanical stress promotes osteoclast formation through RANKL expression on synovial cells. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod.* 2007; (103): 334-341.
 78. Rubin J, Murphy T.C, Fan X, Goldschmidt M, Taylor W.R. Activation of extracellular signal-regulated kinase is involved in mechanical strain inhibition of RANKL expression in bone stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2002; (17): 1452–1460.
 79. Rubin J, Murphy TC, Zhu L, Roy E, Nanes MS, Fan X.. Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK. *J Biol Chem*, 2003; (278):34018–34025.
 80. Kook SH, Son YO, Hwang JM, Kim EM, Lee CB, Jeon YM et al. Mechanical force inhibits osteoclastogenic potential of human periodontal ligament fibroblasts through OPG production and ERK-mediated signaling. *J. Cellular Biochem*, 2009; (106): 1010-1019.
 81. Xu XY, Guo C, Yan YX, Guo Y, Li RX, Song M, et al. Differential effects of mechanical strain on osteoclastogenesis and osteoclast-related gene expression in RAW264. 7. *Cells. Mol Med Rep*, 2012;(6): 409-415.

82. Krishnan V, Davidovitch Z.. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; (129):469.e1-32.
83. Gu G, Lemery SA, King GJ. Effect of appliance reactivation after decay of initial activation on osteoclasts, tooth movement, and root resorption. *Angle Orthod.* 1999 ;(69):515-22.
84. Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001; (120):477-89.
85. N-acetylcysteine Introduction. *Alternative Medicine Review.* Volume 5, Number 5. 2000. Disponible en: <http://www.altmedrev.com/publications/5/5/467.pdf>

Evaluación de la capacidad de diferenciación de células de sangre periférica hacia el linaje osteoclastico en diferentes tiempos de aplicación de fuerza tensil.

Evaluation of differentiation ability of peripheral blood cells towards osteoclast lineage at different times of application of tensile strength.

María Alejandra Montero Córdoba.¹ Natalia Carrillo Mendigaño.²

1. Odontóloga. Residente Ortodoncia. Universidad Nacional de Colombia. mamonteroc@unal.edu.co
2. Ortodoncista. Magister en Ciencias Biológicas. Docente Universidad Nacional de Colombia. ncarrillom@unal.edu.co

Resumen

Introducción y objetivos: Los Osteoclastos se encuentran muy relacionados con el movimiento dental ortodóntico, ya que activan el proceso de remodelado óseo involucrando eventos de resorción. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de diferenciación de células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) hacia el linaje osteoclastico en diferentes tiempos de activación con fuerzas tensiles

Materiales y métodos: Células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) fueron aisladas mediante un gradiente de Fycoll-Hypaque y estimuladas con 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) durante 72 h. Un grupo de células fue sometido a fuerzas de 5,28g/cm² y otro grupo de células fueron fusionadas con Polietilenglicol (PEG), Las células fueron tratadas o no con N-acetilcisteína (NAC) y evaluadas en un periodo de 3, 5 y 7 días. Se evaluó la actividad de la enzima tartrato resistente (TRAP), la expresión del marcador Integrina β3, y la actividad resortiva

Resultados: Se encontró que al fusionar células con PEG, o aplicar una fuerza a células no fusionadas por 3, 5 y 7 días se inducen marcadores característicos de células osteoclasticas y actividad resortiva, siendo el día 7 el de mayor expresión. También se determinó que NAC es un potente inhibidor de las actividades relacionadas con células resortivas.

Conclusión: Fusionar células con PEG, o aplicar fuerza a células no fusionadas por 3,5 y 7 días, se inducen marcadores característicos de células osteoclasticas y actividad resortiva.

Palabras clave: Osteoclasto. Resorción, Movimiento dental, Células mononucleares, Polietilenglicol, N-acetilcisteina.

Abstract

Introduction and objectives: Osteoclasts are related to orthodontic tooth movement, as they activate the process of bone remodeling events involving resorption. The aim of this study was to evaluate the ability of differentiation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to the osteoclast lineage in different activation times with tensile forces

Materials and Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by a gradient of Fycoll-Hypaque and stimulated with 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA) for 72 h. A group of cells was subjected to forces 5,28g / cm² and another group of cells were fused with polyethylene glycol (PEG), cells were treated or not with N-acetylcysteine (NAC) and evaluated over a period of 3, 5 and 7 days. Activity tartrate-resistant enzyme (TRAP), marker expression Integrin β₃, and resorptive activity was evaluated.

Results: It was found that by fusing cells with PEG, or apply a force to unfused cells by 3, 5 and 7 days, The cells showed markers characteristic of osteoclast cells and resorptive activity, the day 7 showed higher expression. It also found that NAC is a potent inhibitor related activities resorptive cells.

Conclusion: Fuse cells with PEG, or apply force to unfused cells for 3, 5 and 7 days, markers characteristic osteoclastic cells are induced and resorptive activity.

Keywords: osteoclast. Resorption dental movement, mononuclear cells, Polyethylene glycol, N-acetylcysteine.

Introducción

El mantenimiento de la homeostasis ósea es crucial para el adecuado desarrollo del esqueleto durante toda la vida, éste depende de la interacción continua entre los osteoclastos, que degradan o reabsorben el hueso, y los osteoblastos, que forman hueso. Los orígenes de estas células están bien establecidos, los osteoblastos se derivan de células madre mesenquimales, mientras los osteoclastos son células altamente especializadas, multinucleadas que se derivan de las células madre hematopoyéticas, específicamente a partir de células del linaje monocito-macrófago(1). Estos dos tipos celulares, se encuentran muy relacionados con el movimiento dental ortodóntico, ya que una vez aplicada una fuerza ortodóntica sobre el diente se desencadenan una serie de fenómenos que activan el proceso de remodelado óseo involucrando eventos de resorción y aposición ósea lo que permite el desplazamiento dental.

Sistemas que involucran factores mecánicos han sido utilizados para lograr la diferenciación de osteoclastos; se ha reportado en la literatura que ante un estímulo mecánico las células del ligamento periodontal (LP) apoyan la osteoclastogénesis(2). Estudios realizados en el laboratorio de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina de la UNAL sugieren que células fibroblastoides de origen gingival, células

mononucleares de sangre periférica y células de origen monocito-macrófago sometidas a fuerzas y fusionadas con polietilenglicol (PEG) presentan actividad osteoclástica(3)(4)(5).

Ante la aplicación de un estímulo mecánico sobre el diente se generan factores que estimulan la diferenciación osteoclástica en el LP permitiendo el movimiento dental, pero aún no está bien establecido el origen exacto de estas células, se sugiere que pueden derivar de la activación de osteoclastos ya maduros presentes en el LP o de la proliferación de células madre de tejidos hematopoyéticos distantes o de las células madre locales(6), también se ha indicado que la tasa de reclutamiento o la diferenciación de osteoclastos podría depender del régimen de la fuerza y del nivel de fuerza aplicada sobre el diente(7)

Por lo tanto es importante evaluar si la diferenciación de las células mononucleares de sangre periférica (CMNSP) hacia el linaje osteoclástico es constante o presenta alguna modificación al aplicar una fuerza y al fusionarlas con PEG en diferentes periodos de tiempo, obteniendo un modelo sencillo y fácil de reproducir para el estudio de la actividad resortiva semejante al que puede ocurrir en un tratamiento ortodóntico.

Materiales y métodos

Muestra: células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Las células mononucleares de sangre periférica se adquirieron tomando una muestra de 20 mL de

sangre periférica de un donante voluntario, de 27 años de edad, género femenino, sano sistémicamente, mediante punción en el pliegue anterior del brazo, con un jeringa previamente heparinizada con 2µL de heparina sódica 5000 UI en 5mL. Posteriormente se diluyó con 30 mL de RPMI 1700 y se agregó Fycoll-Hypaque en una proporción de 1:3 (v:v) se centrifugó a 1200 r.p.m durante 30 minutos. Mediante una pipeta se tomó la interface opaca que contiene las CMNSP depositándolas en un nuevo tubo. Se realizaron tres lavados con medio RPMI 1700 y se centrifugaron a 1200 rpm durante 6 minutos cada uno.

División de la muestra

La muestra se dividió en 6 grupos.

7. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza (control negativo) **(-fu, -F)**
8. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza, con NAC **(-fu, -F, + NAC)**
9. CMNSP no fusionadas tratadas con fuerza **(F)**
10. CMNSP no fusionadas tratadas con fuerza, con NAC **(F +NAC)**
11. CMNSP fusionadas con PEG (control positivo) **(PEG)**
12. CMNSP fusionadas con PEG, con NAC **(PEG +NAC)**

Para cada grupo se utilizaron 12 láminas de hueso las cuales fueron evaluadas en tres tiempos diferentes: al 3, 5 y 7 día

Cultivo de CMSP

Las células se cultivaron en cajas Petri con medio RPMI 1700 suplementado con SFB (suero fetal bovino) al 10 % (v/v), en presencia de 10 µL de Fitohemaglutinina (PHA) con el fin de estimular Linfocitos T, se llevaron a incubadora a 37°C, 95% de humedad y atmosfera de CO₂ al 5%. Luego de 72 horas de cultivo se recolectaron las células en suspensión y las adherentes las cuales fueron desprendidas con una solución de PBS-EDTA 1mM (p/v) por 10 minutos a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas con medio libre de SFB y centrifugadas a 1200 r.p.m. durante 5 minutos.

Fusión celular con PEG

Luego de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo sobre gasa estéril para eliminar todo residuo de RPMI y evitar diluir el polietilenglicol (PEG). Se agregó 50 µL de PEG de peso molecular 3000, previamente calentado a 37° C, se agito suavemente, mediante golpes con el dedo en la base del tubo, para homogenizar el botón celular en el PEG y se llevó a 37° C durante 5 minutos. A partir de ese momento se adicionó 40µL de RPMI cada 60 segundos por 5 minutos, posteriormente 80 µL de RPMI durante 5 minutos y 160 µL de RPMI durante 5 minutos, Posteriormente las células se centrifugaron por 5 minutos a 1200 rpm y se lavaron dos veces con RPMI para retirar el PEG. Posteriormente se

suspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado en SFB al 10%. La técnica de fusión, los volúmenes del medio y los tiempos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo de Moniere- Faugere et al. 2001

Láminas de hueso

Se utilizó hueso cortical de pelvis bovina, el cual se cortó transversalmente con sierra, se pulió con esmeril, discos de carburo de grano grueso y fino y piedra rosada hasta obtener laminas con un área de 6mm^2 y grosor de 0.5mm. Estas laminas se sumergieron en una solución de SDS (Dodecil sulfato de sodio) al 10% por 8 horas bajo agitación continua, se lavaron doce veces con agua destilada hasta eliminar totalmente el detergente, posteriormente se esterilizaron con etanol al 70% por 60 minutos y finalmente se lavaron dos veces con medio RPMI suplementado con 10% SFB. Las cajas fueron esterilizadas finalmente con luz ultravioleta durante un día.

Siembra

Se utilizaron 12 láminas de hueso para cada grupo evaluado, realizando la siembra en tres cajas de 24 pozos cada una, se colocaron aproximadamente 450 células en $35\mu\text{L}$ con un porcentaje de viabilidad del 100%.

A cada lamina de hueso estéril del grupo de fusión (24 en total), se les aplicó $10\mu\text{L}$ de la suspensión de células fusionadas con PEG en $30\mu\text{L}$ de medio de cultivo; para permitir la

adhesión de las células se dejaron durante 4 horas en incubadora a 37°C , 95% de humedad y atmósfera de CO_2 al 5%. Transcurrido este tiempo se agregó $400\mu\text{L}$ de medio con SFB al 10% en cada pozo, para los grupos de células tratadas con NAC, se agregó 30Mm a cada pozo de preparado de NAC con PBS.

Aplicación de fuerza

Los grupos a los que se les aplicó fuerza (+F), (24 en total), se posicionaron en un motor rotatorio horizontal (Rototorque – ColeParmer®) a velocidad No. 8 (44 r.p.m), transcurrido 3 días se retiraron las 8 láminas y se fijaron las células con $43\mu\text{L}$ de formaldehído diluido en $400\mu\text{L}$ de PBS. Así mismo se procedió con los diferentes grupos. Para los días 5 y 7, se siguió el mismo protocolo. Para determinar la fuerza a la cual fueron sometidas las células se utilizó la fórmula descrita en el artículo ya publicado(61). Al calcular la fuerza ejercida sobre las células se estableció que fue de 5.28 gr/cm^2 .

$$P = (m \times r \times \text{r.p.m.}^2 \times \pi^2) / (A \times 9.8 \times 900),$$

Donde P es la presión en Kg por cm^2 , m: la masa del medio, r: el radio del motor rotatorio, r.p.m: revoluciones por minuto y A: el área de contacto entre el medio y las células.

Siendo $m = 0.015\text{ gr}$, $r = 0.065\text{m}$, $A = 4\text{ cm}^2$ y $\text{r.p.m} = 44$

Fijación

Cada grupo de células se fijaron al 3, 5 y 7 día con 43 μL de Formaldehído, dejándolas con 400 μL de PBS a temperatura ambiente. Posteriormente se evaluó la actividad de la enzima TRAP, se realizó prueba de inmunofluorescencia para el anticuerpo: Integrina β_3 y por último se realizó evaluación de la actividad resorptiva.

Determinación de la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP).

Este procedimiento fue realizado según protocolo del grupo de investigación de patología de la universidad de Nottingham(8), se retiró el PBS en el que se encontraban las láminas óseas y se dejó secar al medio ambiente. Para obtener la tinción, primero se preparó el buffer veronal 10 mL que contenía barbitona de sodio (ácido barbitúrico 0.006625 g y 0,01375 g de NaOH) y 0,048375 g de acetato de sodio. A este buffer veronal se le adicionó 0,0291 g de tartrato de sodio-potasio, luego, se agregó una solución formada por 375 μL de pararrosanilina hexasotizada y 375 μL de nitrito de sodio en hielo. Después, se adicionó 0,00475g de naftol fosfato MX-ASB1 (Sigma-Aldrich), usado como sustrato de la enzima TRAP. A esta solución se le ajustó el pH a 4.6 +/- 0.2.usando ácido clorhídrico. Cada lámina fue incubada con 300 μL de esta solución a 37 ° C durante 2 h, se hizo un solo lavado con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.

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

Inmunofluorescencia indirecta

Se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta sobre los siguientes grupos: 1. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza (-fu, -F), 2. CMNSP no fusionadas, no tratadas con fuerza + NAC (-fu, -F), 3. CMSP no fusionadas tratadas con fuerza, (F) 4. CMNSP no fusionadas tratadas con fuerza + NAC (F+NAC). Para determinar la expresión del marcador integrina β_3 generado en cabra. Las láminas de hueso fueron lavadas 3 veces con una solución de PBS, dejando 2 minutos entre cada lavado, a cada lamina se agregó 30 μL de la solución con el anticuerpo primario y se incubo durante 1 hora en cámara húmeda. Las láminas se lavaron nuevamente 3 veces con solución de PBS y se secaron por debajo con una servilleta y se cambiaron de caja. Se agregó 30 μL de solución de anticuerpo secundario FITC anti-cabra, ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz Biotechnology), junto con la tinción DAPI y se incubo durante 30 minutos en cámara húmeda y en total

oscuridad. Se lavaron 3 veces con PBS cada 2 minutos. La lámina ósea se colocó sobre una laminilla porta objetos, sobre las láminas de hueso se colocó una laminilla cubre objetos, se colocó aceite de inmersión y se observó la inmunofluorescencia en un microscopio Vanguard® con un objetivo 100x. Toda la superficie de cada una de las láminas óseas fue evaluada y se tomaron varias fotos representativas para cada grupo. Para detectar la positividad de la prueba, se observaron primero las células con luz blanca y estas mismas deberían emitir fluorescencia cuando fueran observadas con el lente indicado para esto. Si no había presencia de ninguna masa fluorescente se declaró negativa para dicho marcador.

Evaluación de la actividad resorptiva

Para poder observar las lagunas de reabsorción se procedió primero a retirar las células de las láminas óseas. Para lisar las células se utilizó el detergente SDS al 10% (dodecil-sulfato sódico), esta solución se dejó por 30 minutos bajo agitación continua, luego se procedió a desprender mecánicamente las células y residuos persistentes utilizando un cepillo dental de cerdas suaves, se lavaron con agua destilada cinco veces, bajo agitación continua.

Posteriormente las láminas fueron teñidas con el colorante azul de Coomassie (0.25% Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético 40%

H₂O) por 30 minutos. El hueso se decoloró con una mezcla de metanol, ácido acético y agua (50:10:30%, V/V) dejándolo actuar por 15 minutos. Finalmente, las láminas fueron lavadas con agua destilada bajo agitación continua y se secaron a temperatura ambiente. Para realizar el conteo se tomaron fotos representativas de cada grupo, evaluadas con el objetivo 40X en un microscopio de luz Vanguard®, con una cámara Panasonic® DMC-FHS. Se contó el número de lagunas de reabsorción en cada campo y se describió su morfología.

Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como el promedio calculado de 4 repeticiones en cada uno de los grupos evaluados en tres periodos de tiempo: al 3, 5 y 7 día. Las comparaciones estadísticas entre los grupos de tratamiento se realizaron mediante análisis de varianza ANOVA de Doble vía complementado con un test de comparaciones múltiples de Fisher. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con un valor $p < 0.05$.

Resultados

Expresión de la enzima TRAP al 3, 5 y 7 día de cultivo

Durante la observación al microscopio de todas las láminas óseas se identificaron en todos los grupos evaluados masas de células morfológicamente irregulares, de tamaño variable, con una coloración que vario de una tonalidad café a

rojo ladrillo presentando diferentes intensidades de color.

En las láminas óseas del grupo PEG se observó que las células se encontraban agrupadas en masas de mayor tamaño, con forma irregular y con alta intensidad de coloración. El patrón de ubicación fue uniforme en todo el recorrido del hueso (Imagen 1. A.B) a diferencia del grupo de F (grupo de aplicación de fuerzas), en las que se observaron pequeños grupos celulares, algunos redondeados y ubicados predominantemente en la periferia del hueso, en estas láminas se observaron variaciones en la intensidad de color.(Imagen 1. C.D). Para los grupos tratado con NAC se observaron en su mayoría grupos celulares pequeños y dispersos con una intensidad baja del color. (Imagen 1 E.F.G.H)

La cantidad de células TRAP positivas tanto en el grupo F, como en el grupo PEG fue mayor en comparación al grupo que no se fusiono ni fue sometido a fuerza(-fu, -F), en los tres periodos de tiempo evaluados (3, 5 y 7 día de cultivo), presentando una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Tabla 1 y 2).

Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el número de células TRAP positivas encontradas en los grupos F y PEG a los 3, 5 y 7 días. (tabla 3).

Tanto en el grupo F como en el grupo PEG se observó un aumento significativo de células TRAP positivas al día 3 de cultivo

comparándolo con el grupo -fu, -F; la cantidad de células TRAP positivas incrementó al día 5 y 7 de cultivo para ambos grupos. Al análisis estadístico se encontró una diferencia estadísticamente significativa comparando la cantidad de células TRAP positivas en los días 3 y 5 y entre los días 3 y 7, pero no entre los días 5 y 7, para ambos grupos (tablas 4 y 5).

Los grupos que fueron tratados con NAC, (F+NAC) y (PEG+NAC), presentaron una evidente disminución del número de células TRAP positivas comparados con los grupos sin aplicación de NAC: F y PEG (tablas 6 y 7). Por otra parte, al comparar los grupos F+NAC y PEG+NAC con el grupo control negativo (-fu,-F) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células TRAP positivas (tablas 8 y 9)

Evaluación de la actividad resortiva al 3, 5 y 7 día de cultivo

Una vez retiradas las células del hueso y teñidas con azul de Coomassie se procedió a observar al microscopio las lagunas de reabsorción formadas por estas en cada uno de los grupos evaluados.

Las láminas de hueso del grupo celular PEG mostraron un número elevado de lagunas de reabsorción, con un patrón de forma irregular sin bordes definidos; aunque las lagunas tenían tamaños variables, predominaron las de mayor tamaño y de gran profundidad fácilmente visibles durante el recorrido del

hueso. (Imagen 2. A.B).Mientras que en el grupo de PEG +NAC se observaron pocas cantidades de lagunas de menor tamaño, igualmente amorfas (Imagen2 C.D)

Al evaluar las láminas de hueso del grupo celular F, se encontraron lagunas de reabsorción con bordes difusos, de menor tamaño y superficiales, en algunas láminas las lagunas se observaron agrupadas en forma de racimo y en otras láminas se encontraron aisladas (Imagen 2. E.F), en el grupo de F+NAC. Se encontraron lagunas en un número reducido, superficiales y aisladas (Imagen 2 G.H)

Realizando una comparación en el número de lagunas de reabsorción del grupo PEG y el grupo control negativo (-fu, -F), se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, siendo PEG el de mayor número, en cada uno de los días evaluados. (tabla 10), igualmente ocurrió en el grupo F, en donde el número de lagunas de reabsorción fue mayor comparándolo con el grupo control negativo (-fu, F), encontrándose una diferencia estadísticamente significativa en los tres periodos de observación (tabla 11). Las láminas óseas del grupo PEG y del grupo F mostraron cantidades de lagunas de reabsorción similares, en donde la diferencia entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa en el 3 y 7 día de cultivo.(tabla 12). Los grupos tratados con NAC: ((F+ NAC) y (PEG + NAC)) presentaron una disminución estadísticamente

significativa en el número de lagunas de reabsorción en comparación con los grupos F y PEG, respectivamente (tabla 13 y 14)

Las lagunas de reabsorción para el grupo F y PEG se presentaron a partir del 3 día de cultivo, el número se incrementó para los días 5 y 7 en ambos grupos. Se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar el número de lagunas del 3 día con el 5 día, del 3 día con el 7 día y del 5 día con el 7 día, tanto para el grupo F como para el de PEG. (Tabla 15 y 16)

Evaluación de la expresión del marcador osteoclástico integrina $\beta 3$ al 3, 5 y 7 día de cultivo.

Durante la evaluación de los marcadores por inmunofluorescencia, se observó que el grupo tratado con fuerza presentó fluorescencia leve para el marcador de integrina $\beta 3$. Las zonas fluorescentes se observaron de tamaño pequeño, asemejando células aisladas con forma irregular sin bordes definidos. Estas pequeñas masas se observaron en la periferia de la lámina ósea. (Imagen 3 A) El porcentaje de fluorescencia encontrado en el grupo de fuerza fue de 5%, 15% y 25% al 3, 5 y 7 días respectivamente, es decir que incremento con el tiempo. En los grupos control negativo (-fu, -F) y los tratados con NAC no se evidenció ningún tipo de fluorescencia en todo el recorrido de la lámina ósea para los tres periodos de tiempo evaluados.(Imagen 3. B.C)

Discusión

La resorción ósea desencadenada por los osteoclastos es crucial para generar un movimiento dental ortodóntico, Roberts (9) afirma que "la resorción ósea es el factor que limita la velocidad de movimiento de los dientes", por lo tanto, la velocidad a la que un diente se puede mover a través del hueso podría estar restringido principalmente por el número y la actividad de los osteoclastos. Basados en esto, la aparición de los osteoclastos se considera paso necesario e importante para que ocurra el movimiento dental; por esto es importante para los ortodoncistas entender el efecto de la fuerza en la activación de los osteoclastos

Los osteoclastos son grandes células gigantes multinucleadas que expresan actividad de la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) y tienen la capacidad de formar cavidades de resorción en hueso y dentina. Estos osteoclastos se derivan a partir de progenitores hematopoyéticos del linaje de monocitos-macrófagos (10). En este experimento se utilizaron células mononucleares de sangre periférica CMNSP humanas que comprenden una población mixta de células mononucleares que contiene monocitos / macrófagos, precursores tempranos de los osteoclastos del linaje de monocitos, y linfocitos T y B. las CMNSP, no contienen células estromales o precursores de células del estroma. (11)

Las CMNSP fueron cultivadas con adición al cultivo de

fitohemaglutinina, Estudios realizados in vivo e in vitro han mostrado que los procesos de diferenciación osteoclastogénica están asociados con un incremento y activación de la población de linfocitos T. Se ha encontrado que estas células producen citocinas como el RANKL, la interleucina -17, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (FSC-GM) y el interferón (IFN) gamma, que tienen efectos reguladores de gran alcance en la osteoclastogénesis.(12)(10)(13). Con esta premisa se han desarrollado modelos para la generación de osteoclastos utilizando CMNSP agregándoles fitohemaglutinina(PHA) lo que estimula la proliferación de linfocitos T, logrando obtener osteoclastos a partir de monocitos.(11)(14). Además se ha reportado que la presencia del marcador CD13 y CD14 en las CMNSP estimuladas con PHA, sugiere que existen poblaciones reportadas como precursores in vitro de células similares a osteoclastos, como son las células mielomonocito/dendríticas y los monocitos CD14.(15).

Los efectos del estímulo con PHA en la resorción han sido descritos en osteoclastos extraídos de huesos de ratones adultos, en donde un incremento en el número de estas células y de su actividad resorptiva, ha sido asociado a la presencia de la PHA(16). Lo anterior podría explicar porque algunas CMNSP no fusionadas utilizadas como el control negativo presentaron positividad en el análisis de la enzima TRAP, ya que estas fueron estimuladas con PHA

por 72 horas. De igual manera la presencia de la PHA, ayudaría a incrementar y mantener la función resortiva de las CMNSP en el tiempo.

Los datos obtenidos durante el experimento muestran que las CMNSP obtenidas a partir de la fusión con PEG y luego de someterlas a fuerza expresaron la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) y fueron capaces de formar lagunas de reabsorción en las láminas óseas donde estuvieron cultivadas por 3, 5 y 7 días.

En la evaluación de la expresión de la enzima TRAP y la reabsorción ósea, las células pertenecientes al grupo PEG, se observaron como grandes agrupaciones celulares, con una coloración en su mayoría intensa que varió de rojo ladrillo a café, característica de células TRAP positivas, además las láminas óseas en donde fueron sembradas presentaron grandes y profundas lagunas de reabsorción. Estos resultados son similares a los descritos por anteriores estudios donde se sugiere que el tratamiento de CMNSP con PEG puede inducir la formación de células multinucleares y la reabsorción ósea (14)(5)(17), igualmente, el tratamiento de monocitos de la línea tumoral U937/A y J/774 (4) y de fibroblastos humanos (3) con PEG promueve la formación de células con actividad TRAP positiva y la reabsorción ósea. Basados en estos resultados, se sugiere que PEG induce fusión celular eficientemente produciendo una

célula multinucleada, con actividad similar a los osteoclastos debido a sus dos funciones importantes como son la de agregar las células, cuando extrae el agua entre las membranas y la de aumentar la fuerza osmótica, generando la fusión de las membranas celulares. (18). Estos resultados igualmente son concordantes con otros estudios donde las CMNSP son estimuladas con factores osteoclastogénicos o calcitrópicos para diferenciarlas en células similares a osteoclastos(12)(19)(20). Sin embargo en nuestro estudio obtuvimos células resortivas sin necesidad de estos factores demostrando un modelo fácil de reproducir y más económico para el estudio del proceso de reabsorción.

En el experimento se determinó que la actividad resortiva del grupo de células PEG fue mayor al 7 día de observación concordando con los resultados de Castillo y col. (14) donde se cultivaron las CMNSP por 14 días concluyendo que al día 7 se presentó un alto porcentaje de áreas resortivas la cual se mantuvo constante, sin un aumento representativo hasta los 14 días.

En el estudio realizado, Las CMNSP humanas responden ante fuerzas mecánicas activándose en células similares a osteoclastos, siendo TRAP positivas, con capacidad de reabsorción. En los resultados de la evaluación de la enzima TRAP estas células se observaron de menor tamaño que las observadas en el grupo PEG agrupadas pero no fusionadas y localizadas en su

mayoría en la periferia. Este grupo de células formaron lagunas de reabsorción igualmente pequeñas y superficiales, estos resultados son similares a los encontrados en anteriores estudios donde se utilizaron CMNSP(5) y fibroblastos humanos(3), ambos con métodos similares a los utilizados en el presente estudio.

A este respecto, múltiples autores han reportado que diferentes sistemas que involucran factores mecánicos han sido utilizados para lograr la diferenciación de osteoclastos. Sin embargo dependiendo de la naturaleza y magnitud de la fuerza se activan señales que pueden o no, apoyar el proceso de osteoclastogénesis. Kanzaki H. et al(21) refieren que las fuerzas compresivas aplicadas sobre fibroblastos del ligamento periodontal (LP) promueven la producción de citoquinas inflamatorias lo que aumenta la expresión de RANKL sobre estas células que cultivadas con precursores osteoclásticos como CMNSP permiten la diferenciación osteoclastogénica. Igualmente Nakao y col(22) reportan que una fuerza de compresión óptima e intermitente y no continua aplicada sobre un cultivo de fibroblastos del LP promueve la expresión de IL-1, esta señal aumenta la expresión de RANKL, induciendo directamente la osteoclastogénesis en precursores osteoclásticos. Ichimiy H. et al. (77) reportaron que la compresión mecánica estática, aplicada sobre células sinoviales promueve la formación de osteoclastos a través de la expresión de RANKL, luego de que

estas células se cultivaran con células de médula de ratón en presencia del factor estimulante de colonia (FSC-M). Por otra parte, estos mismos autores reportan que la tensión mecánica no apoyaba la osteoclastogénesis, esta premisa es afirmada por otras investigaciones en las que refieren que la aplicación de fuerzas tensiles inhiben la formación de osteoclastos por la disminución de la expresión de RANKL en células estromales de la médula(24)(25).

También se ha reportado que fuerzas centrífugas estimulan la producción de osteoprotegerina (OPG) en fibroblastos gingivales lo cual igualmente inhibe la formación de células similares a osteoclastos, pero en este mismo estudio se encontró que fibroblastos del ligamento periodontal, si lograron inducir un gran número de células multinucleadas TRAP positivas en co-cultivo con células de médula ósea de ratón, en presencia de Dexametasona y vitamina D, causando niveles elevados de RANKL por parte de los fibroblastos(26).

Todos los estudios mencionados previamente fueron realizados mediante co-cultivos de células que expresan RANKL (como fibroblastos de LP y células estromales) con precursores osteoclásticos acompañados generalmente de algún estímulo externo como FSC-M, RANKL, Vitamina D3, dexametasona, entre otros de tal forma que no se establece si es la fuerza la que genera directamente la sobreexpresión de RANKL o son las citoquinas

agregadas en los cultivos. Con este estudio proponemos un nuevo modelo de generación de células con actividad osteoclástica debido a que no se utilizó ningún agente externo y tampoco se generó un cocultivo, es decir que la fuerza que actuó directamente sobre las CMNSP logró diferenciarlas hacia células con actividad resortiva.

Un hallazgo importante en el experimento es que se determinó que no hubo una diferencia estadísticamente significativa en el número de células TRAP positivas y en el número de lagunas de reabsorción entre los grupos tratados con fuerza en comparación con los grupos tratados con PEG. Esto nos sugiere que la aplicación de la fuerza puede ser tan eficiente en la diferenciación de células osteoclásticas como lo es en la fusión con PEG.

Xu y col(27) Realizaron un estudio donde se aplicaron diferentes magnitudes de tensión a células RAW264.7 tratadas con FSC-M y RANKL. Los investigadores encontraron que fuerzas tensionales de baja magnitud suprimen la fusión y activación de osteoclastos, mientras que fuerzas tensionales de alta magnitud (2.000 y 2.500 $\mu\epsilon$) aplicadas dentro de la carga fisiológica promueve la fusión y activación de los osteoclastos, relacionando la expresión de RANK con una respuesta mecánica dependiente de la magnitud. Hiroyuki y col (21) reportan que ante el

estímulo de una fuerza compresiva aplicada sobre células del LP en cocultivo con CMNSP, el número de células TRAP positivas se maximiza con cargas más pesadas y de mayor duración (2 g / cm² y 24 h), Ichimiya(23) también concluyo que fuerzas compresivas de 2g/cm² aplicadas por 12 horas a un co-cultivo de células sinoviales con células de médula ósea de ratones, promovió la formación d células osteoclásticas en comparación con una fuerza compresiva de 1g/cm².

Nakao y col(22) examinan el mecanismo molecular de células del LP humanas luego de aplicar un fuerza continua e intermitentes de 2g/cm² y 5 g/cm² concluyendo que hay un aumento de la expresión del RANKL al aplicar una fuerza intermitente en comparación con una fuerza continua para ambas magnitudes de fuerza. Basado en lo anterior, se podría concluir que la magnitud de la fuerza tiene gran influencia en la activación de los osteoclastos. En este estudio se aplicó una fuerza de 5g/cm² la cual fue óptima para obtener células TRAP positivas y con actividad resortiva. En la mecanoterapia ortodóntica se estima que fuerzas ligeras que no exceden la presión sanguínea capilar de 20 a 25 g / cm² son adecuadas para que el movimiento dental ocurra (28)

Durante la aplicación de una fuerza mecánica ortodóntica sobre el LP, se produce una liberación de diferentes citoquinas, entre las que se encuentra el RANKL inductor importante para el proceso de osteoclastogénesis(28).

El tiempo óptimo luego de aplicar una fuerza ha sido evaluado con el fin de conocer el rango de tiempo donde es posible la activación celular osteoclástica necesaria para que ocurra el movimiento dental. Roberts y Ferguson(9) encontraron que el número de osteoclastos por unidad de área de superficie de hueso muestran un nivel de pico de 50 horas (aproximadamente 2 días después de la aplicación de la fuerza de ortodóntica). Gaoman y col(29) realizan un estudio en un modelo animal de ratón donde aplican una fuerza mecánica sobre los molares y refieren que los osteoclastos demoran en aparecer entre 3 y 5 días luego de la aplicación del estímulo. Igualmente Rody y col(30) aplicaron una fuerza ortodóntica sobre molares de ratones y analizaron el sitio de compresión, donde se observó un número significativo de preosteoclastos en el ligamento periodontal y en la superficie del hueso en el 3 día.

Estos estudios apoyan los resultados obtenidos en esta investigación donde se encontró que a partir del tercer día de aplicación de la fuerza se obtuvieron células TRAP positivas y capaces de formar lagunas de reabsorción sobre el hueso donde fueron sembradas. Además se encontró que el número de células TRAP positivas en el grupo F incremento de manera significativa hasta el día 5($p < 0.0001$), pero a partir de este día hasta el día 7 no hubo un aumento estadísticamente significativo ($p: 0.3890$)

En los grupos que se añadió NAC (F+NAC; PEG+NAC) se evidenció una disminución tanto del número de células TRAP positivas como del número de lagunas de reabsorción para los tres periodos de tiempo evaluados (3, 5 y 7 día). Por lo que podemos concluir que el agente oxidante NAC, es un potente inhibidor de las actividades relacionadas con células resorptivas.

Se ha reportado que en cultivos celulares de sangre periférica en presencia de RANKL se obtienen células similares a osteoclastos acompañadas con una producción de ROS. Cuando se aplica al cultivo celular NAC se inhibe la respuesta de las células al RANKL, e inhibe la producción de ROS, impidiendo la diferenciación de osteoclastos.(31)

Toker, H. y col(32) reportan que la administración sistémica de NAC en un modelo experimental de periodontitis en ratas previene la pérdida de hueso alveolar. Esto se explica porque durante el proceso inflamatorio, NAC disminuye la expresión de mediadores inflamatorios inducidos por lipopolisacáridos (IL-1b, IL-6 y IL-8) en células fagocíticas y fibroblastos gingivales; como resultado directo de estas acciones

La NAC actúa como mucolítico, secretolítico y fluidificante de las secreciones. Es de venta libre y es utilizada en personas de todas las edades. NAC tiene valor terapéutico para la reducción de la disfunción endotelial, inflamación, fibrosis, invasión, la erosión del cartílago, la

desintoxicación del fármaco acetaminofén y prolongación de trasplantes. (33)

Debido a que NAC suprime la diferenciación de los osteoclastos, este antioxidante puede conducir a la prevención de la resorción ósea, en ortodoncia podría ser utilizado como un agente para evitar la recidiva del tratamiento ortodóntico y apoyando el periodo de retención.

5. NAC presenta la capacidad de inhibir la diferenciación de células hacia el linaje osteoclástico

Conclusiones

1. El grupo de células fusionadas con PEG presentaron marcadores de osteoclastos activos, por lo cual podemos validar este modelo para el estudio de la reabsorción
2. La acción de la fuerza sobre CMNSP generó una diferenciación positiva de las células hacia el linaje osteoclástico
3. A partir del tercer día de aplicación de fuerzas sobre el cultivo hubo diferenciación de células hacia el linaje osteoclástico
4. Existe una mayor diferenciación de células hacia el linaje osteoclástico al 7 día de aplicación de fuerza que al tercer día

Figura 1. Láminas óseas representativas de células con tinción TRAP positivas, observadas en microscopio de luz (Vanguard®), 40X, **A, B** Grupo PEG; **C, D** Grupo F; **E, F** Grupo PEG+NAC; **G,H**: Grupo F+NAC; **I,J**: Grupo (-fu, -F)

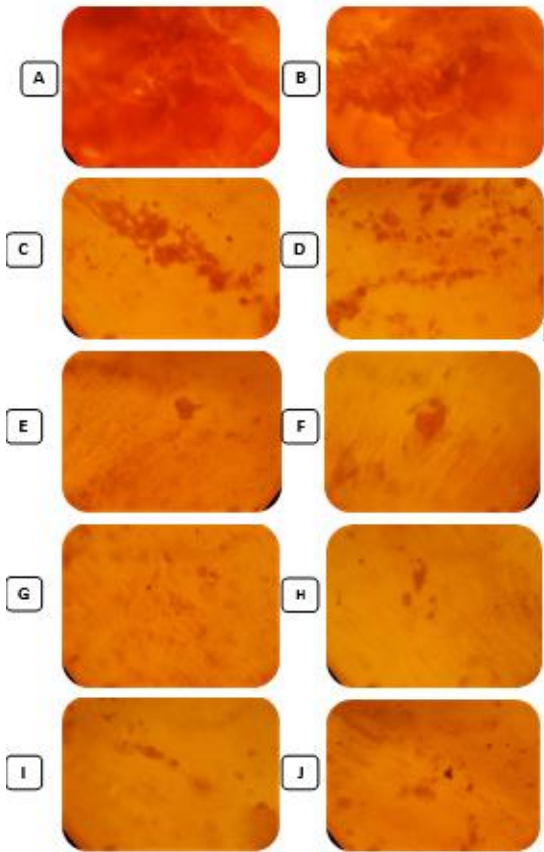


Tabla 1. Cantidad de células TRAP positivas observadas en el grupo sometido a fuerza (F) evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo, en comparación con el grupo no sometido a fuerza ni a fusión (-fu, -F). Diferencia estadísticamente significativa al 3 día de cultivo con un valor de *P: 0.0154, y con un valor de **P<0.0001 al 5 y 7 día de cultivo.

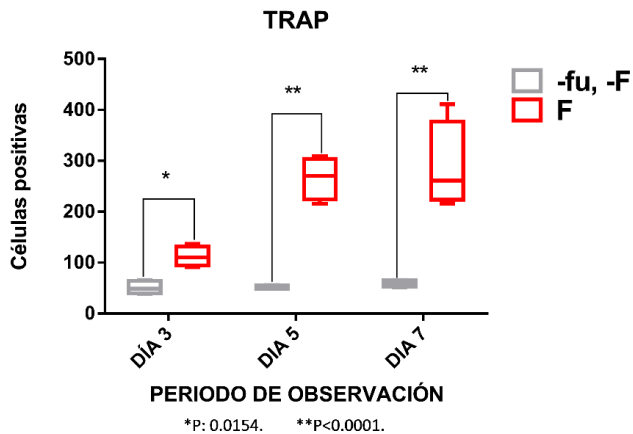


Tabla 2. Cantidad de células TRAP positivas observadas en el grupo tratados con fusión (PEG) evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo, en comparación con el grupo no sometido a fuerza ni a fusión (-fu, -F). Diferencia estadísticamente significativa al 3 día de cultivo con un valor de *P: 0.0020, y con un valor de **P<0.0001 al 5 y 7 día de cultivo.

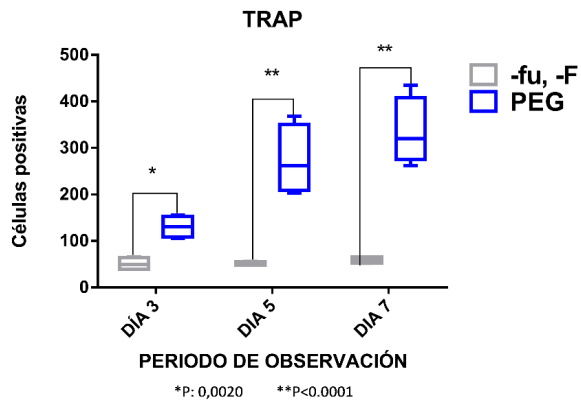


Tabla 3. Cantidad de células TRAP positivas, observadas en el grupo F en comparación con células TRAP positivas del grupo PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia NO estadísticamente significativa entre los grupos en los tres periodos de observación, con un valor de P: 0.04590 al 3 día, un valor de P: 0.7604 al 5 y un valor de P: 0.0601 al 7 día de cultivo.

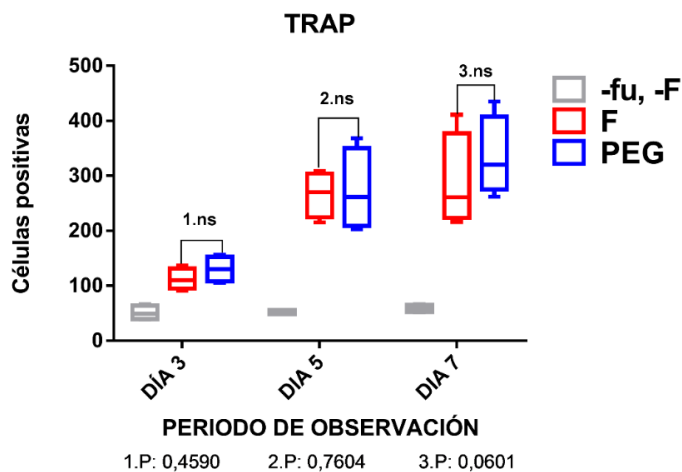


Tabla 4. Cantidad de células TRAP positivas, en los grupos F evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 - 5 y entre los días 3-7 con un valor de $*P < 0.0001$ y una diferencia NO estadísticamente significativa entre los días 5 y 7 con un valor de $P: 0.3890$

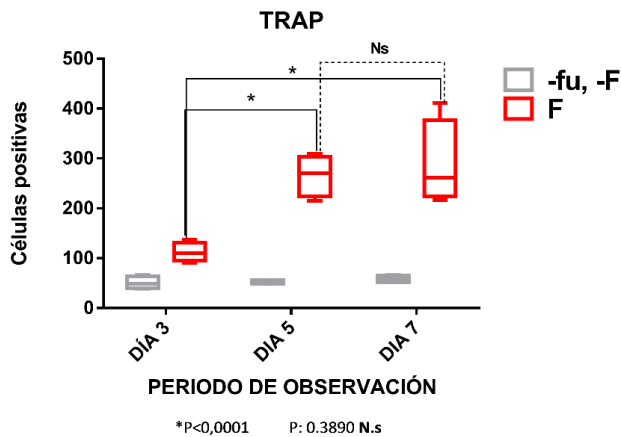


Tabla 5. Cantidad de células TRAP positivas, en los grupos PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 - 5 y entre los días 3-7 con un valor de $*P < 0.0001$ y una diferencia NO estadísticamente significativa entre los días 5 y 7 con un valor de $P: 0.0162$

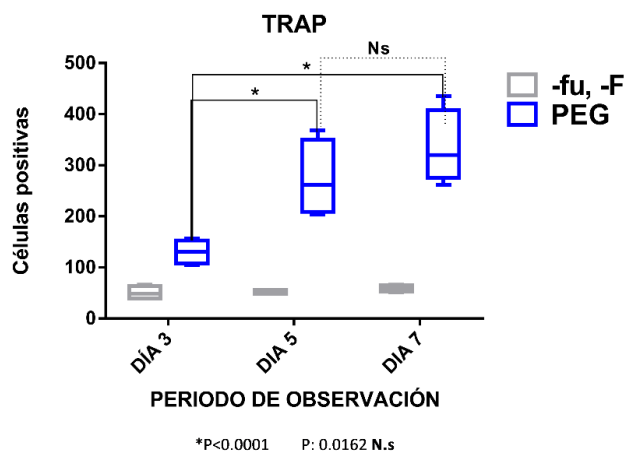


Tabla 6: cantidad de células TRAP positivas en los grupos tratados con fuerza F comparados con los grupos tratados de igual manera adicionándoles NAC (F+NAC) al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de células TRAP positivas en los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa con los grupos a los que no se trató con NAC

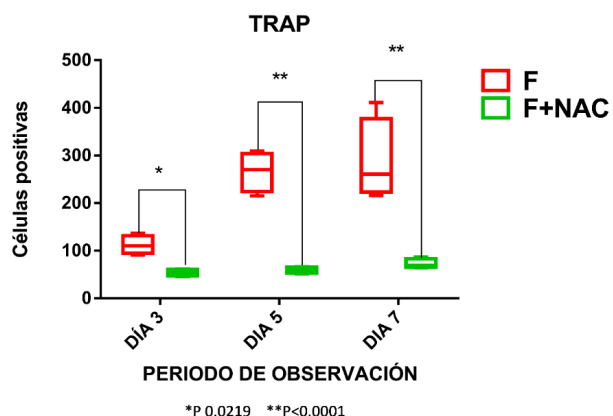


Tabla 7: cantidad de células TRAP positivas en los grupos fusionados con PEG comparados con los grupos tratados de igual manera adicionándoles NAC (PEG+NAC) al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de células TRAP positivas en los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa con los grupos a los que no se trató con NAC

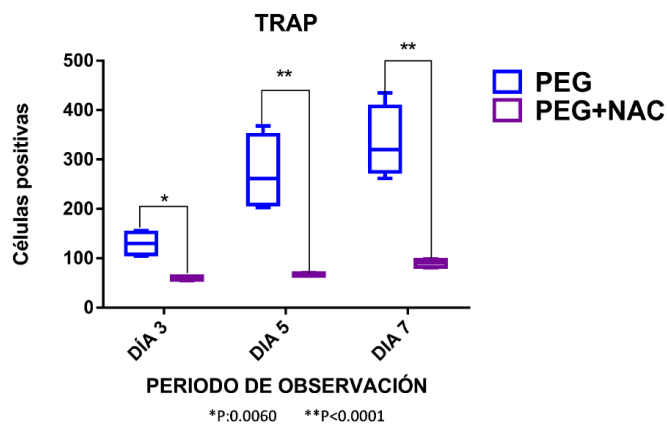


Tabla 8: cantidad de células TRAP positivas en los grupos PEG+NAC, comparados con los grupos (-fu, -F) al 3, 5 y 7 día de cultivo. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ningún periodo evaluado.

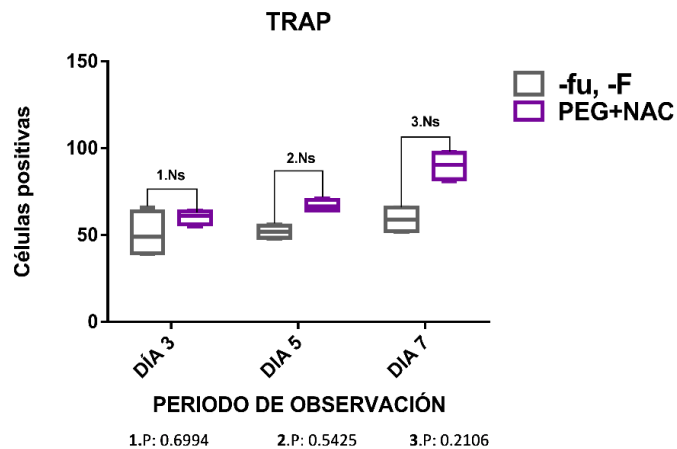


Tabla 9: cantidad de células TRAP positivas en los grupos F+NAC, comparados con los grupos (-fu, -F) al 3, 5 y 7 día de cultivo. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ningún periodo evaluado.

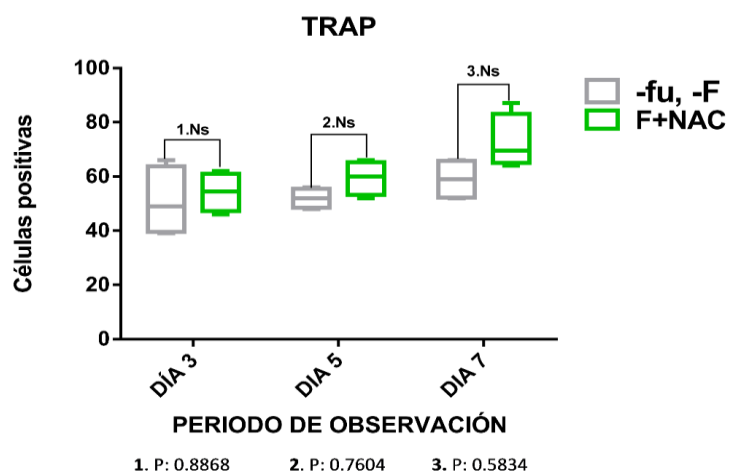


Imagen 2. Microfotografías representativas de lagunas de resorción tinción Coomassie. Observadas a microscopio de luz (Vanguard®) objetivo de 40x, fotografías con cámara Panasonic® DMC-FHS. **A, B** Grupo PEG; **C, D:** Grupo PEG+NAC, **E, F:** Grupo F; **G,H:** Grupo F+NAC, **I, J:** Grupo (-fu,-F)

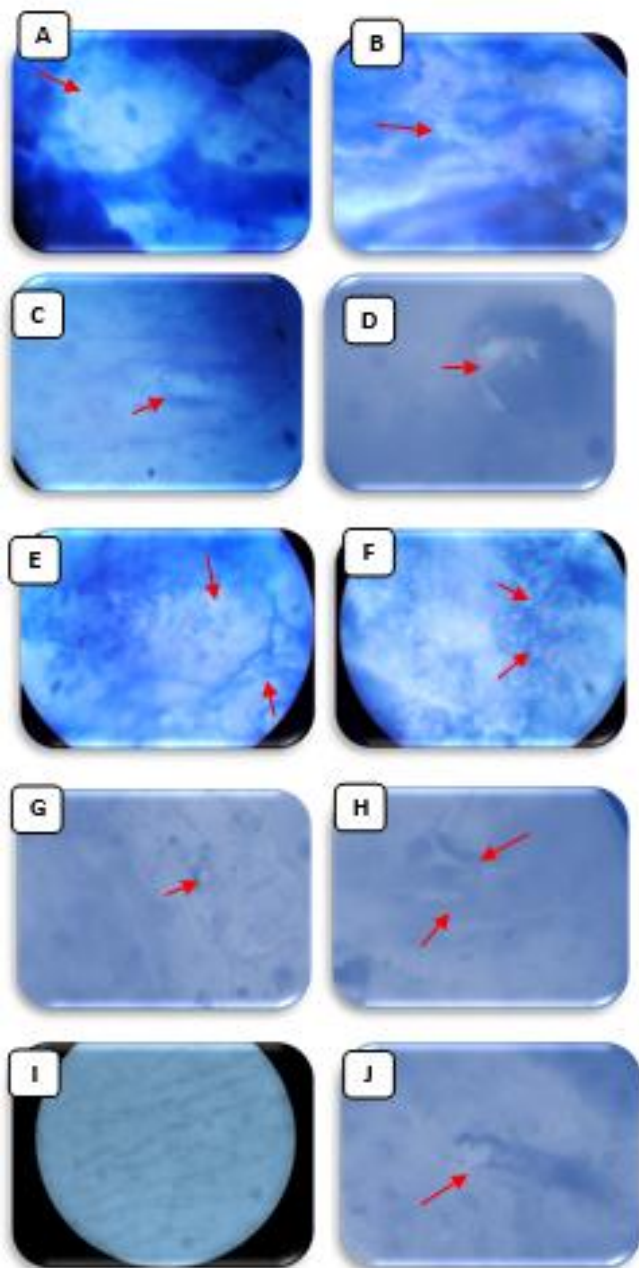


Tabla 10. Número de lagunas de reabsorción evaluadas en los grupos PEG al 3, 5 y 7 día comparándolo con los grupos no tratados con fuerza ni fusión (-fu, F). Diferencias estadísticamente significativas en los tres periodos de tiempo con valores de $*p < 0.0001$

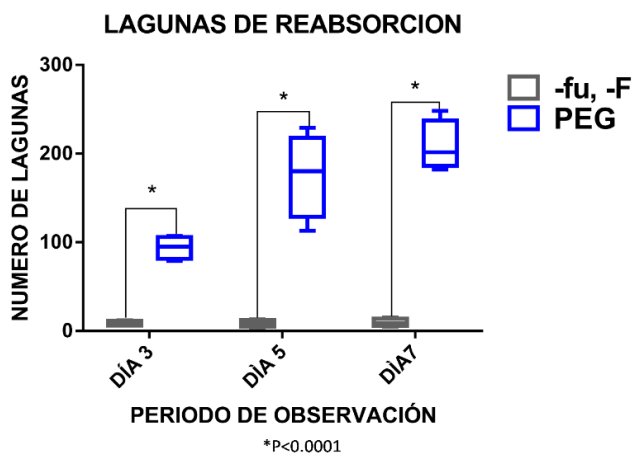


Tabla 11. Número de lagunas de reabsorción evaluadas en los grupos F al 3, 5 y 7 día en comparación con los grupos no tratados con fuerza ni fusión (-fu, -F). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en los tres periodos de tiempo con valores de $*p < 0.0001$

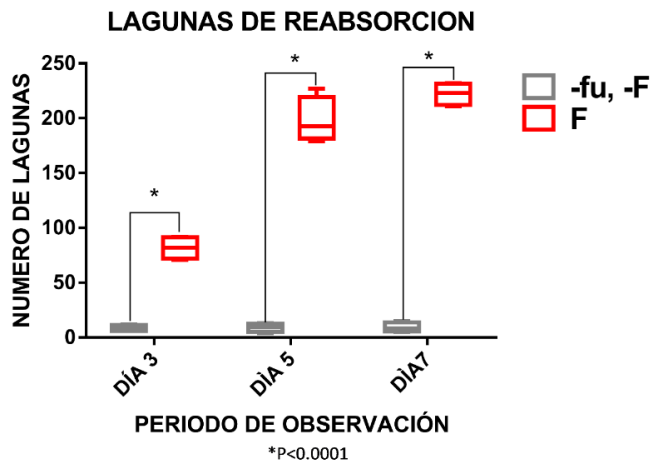


Tabla 12. Número de lagunas de reabsorción en los grupos sometidas a Fuerza (F) en comparación con los grupos tratadas con PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia NO estadísticamente significativa entre los grupos al 3 y 7 días de cultivo, con un valor de P: 0.2635 y 0.2021 respectivamente. En el día 5 de cultivo se presentó una diferencia significativa con un valor de P: 0.0450

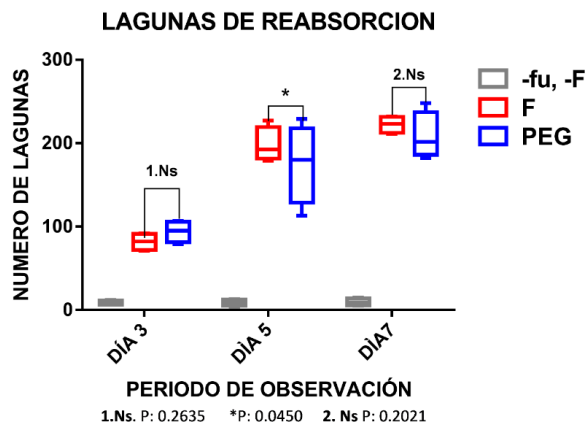


Tabla 13. Número de lagunas de reabsorción en los grupos sometidos a Fuerza F en comparación con los grupos F+NAC al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de lagunas de reabsorción en todos los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los tres periodos de tiempo

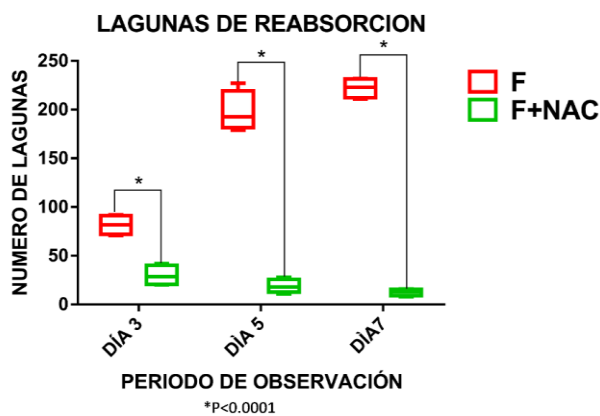


Tabla 14. Número de lagunas de reabsorción en los grupos de PEG en comparación con los grupos de PEG+NAC al 3, 5 y 7 día de cultivo. Se presenta disminución del número de lagunas de reabsorción en todos los grupos tratados con NAC siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los tres periodos de tiempo

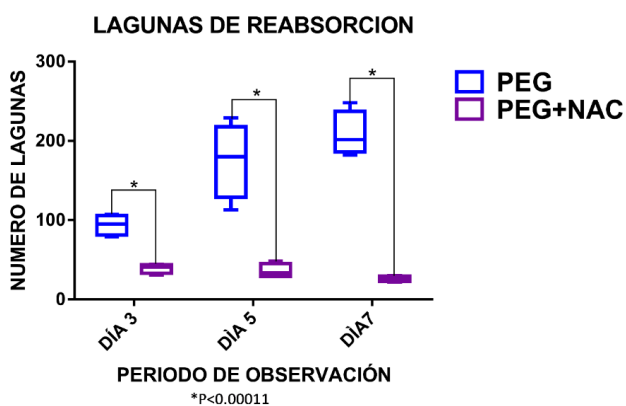


Tabla 15. Número de lagunas de reabsorción, en los grupos de células sometidas a fuerza (F) evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 – 5; 3-7 con un valor de *P<0.0001 y entre el día 5 y 7 con un valor de P: 0.0279

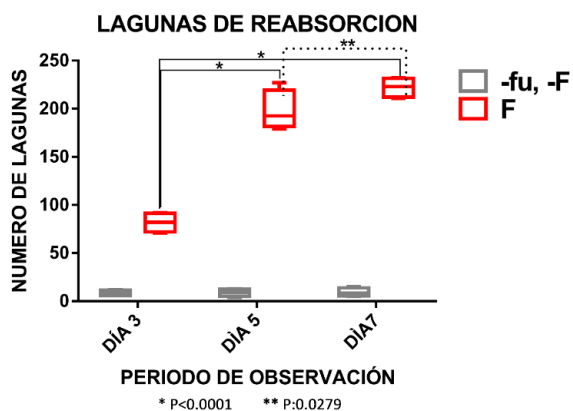


Tabla 16. Número de lagunas de reabsorción, en los grupos de células tratadas con PEG evaluadas al 3, 5 y 7 día de cultivo. Diferencia estadísticamente significativa entre los días 3 – 5; 3-7 con un valor de $*P < 0.0001$ y entre los días 5-7 con un valor de $P: 0.0039$

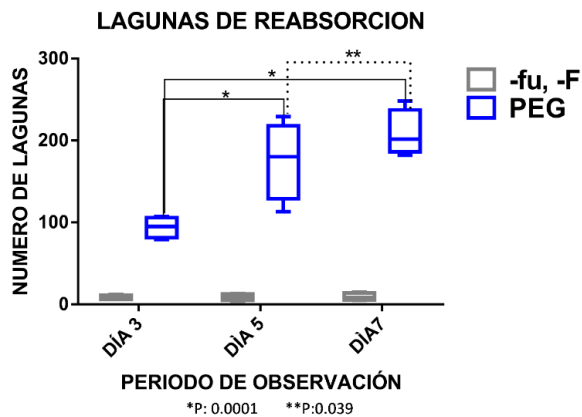
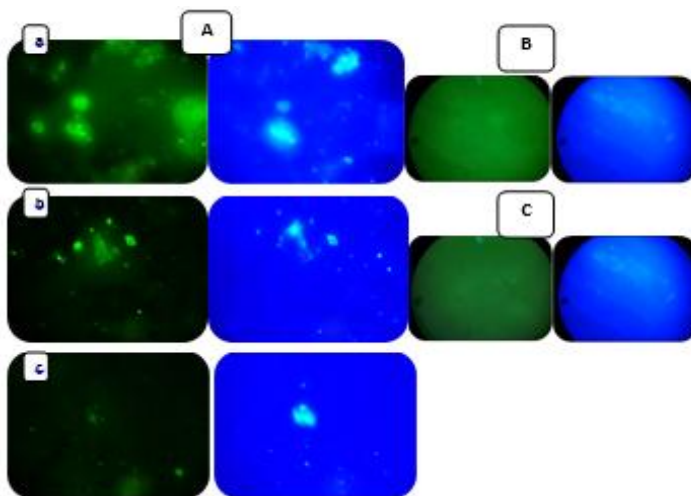


Imagen 3: Microfotografías representativas de inmunofluorescencia. Tinción con 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI. y anticuerpo para integrina B3, evaluados al Microscopio de fluorescencia (Vanguard®) observadas con objetivo de 100x, fotografías con cámara Panasonic®. DMC-FHS. **A.** Grupo F. **a:** 7 día de cultivo. **b:** 5 día de cultivo. **c:** 3 día de cultivo. **B** Grupo F+ NAC; **C** Grupo (-fu,-F)



Referencias

86. Grigoriadis AE, Kennedy M, Bozec A, Brunton F, Stenbeck G, Park IH, et al. Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells *Blood*. 2010;(115):2769-76
87. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res* 2001 ;(80):887–91.
88. Pazos Valencia LB. Análisis de la actividad resorptiva de células fibroblastoides (cultivo primario gingival) luego de someterlas a fuerza tensil o fusionarlas con PEG. Bogotá, 2013. Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de odontología.
89. Murillo A, Guerrero CA, Acosta O, Cardozo CA. Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion. *Biol. Res*. 2010;(43):205-24
90. Bedoya S. Evaluación de la actividad resorptiva de CMNSP fusionadas con polietilenglicol (PEG), tratadas con fuerza centrífuga y con N acetilcisteína (NAC). Bogotá, 2015. Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de odontología
91. Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontics tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001; (120):466-76.
92. Ren Y, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Immunohistochemical evaluation of osteoclast recruitment during experimental tooth movement in young and adult rats. *Arch Oral Biol*. 2005; (50):1032-9.
93. The university Nottingham. [homepage en Internet]. United Kingdom; university Nottingham; c2014 [actualizada 19 Noviembre 2014; consultado 21 febrero 2016]. Disponible en: <http://www.nottingham.ac.uk/>
94. Roberts WE, Jee WS. Cell kinetics of orthodontically-stimulated and non-stimulated periodontal ligament in the rat. *Arch Oral Biol*. 1974;(19):17-21.
95. Udagawa, N., Kotake, S., Kamatani, N., Takahashi, N., Suda, T. The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2002; (4): 281-289.

96. Weitzmann, M.N., Cenci, S., Rifas, I., Haug, J., Dipersio, J., and Pacifici, R. T Cell activation induces human osteoclast formation via receptor activator of nuclear factor κ B ligand-dependent and independent mechanisms. *J. Bone Miner. Res.* 2001;(16): 328-337.
97. Yuasa K, Mori K, Ishikawa H, Sudo A, Uchida A, Ito Y. Characterization of two types of osteoclasts from human peripheral blood monocytes. *Bioch. Bioph. Res. Commu.* 2007; (356): 354–360.
98. Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab.* 2003;(21):337-43.
99. Castillo Im. Evaluación de la expresión y fosforilación de c src, syk y el re-arreglo de actina asociados con la actividad resortiva de cmnsp fusionadas con polietilenglicol. Bogota 2010. Tesis Facultad de Medicina. Universidad Nacional.
100. Alnaeeli, M. Penninger, J, .M., Yen-Tung, A,.T. Immune interactions with CD4+ T cells promote the development of functional osteoclasts from murine CD11c dendritic cells. *J. Immunology.* 2006; (177): 3314–3326.
101. Wang, TM., Jee, WS., Woodbury, LA., and Matthews, JL. Effects of phytohemagglutinin-P (PHA-P) on bone of the growing rat. *Metab. Bone. Dis. Relat. Res.* 1982; (4):193-199
102. Manrique E. G. Evaluación del efecto de fármacos antiresortivos en el fenotipo y actividad resortiva de células mononucleares de sangre periférica humanas fusionadas con polietilenglicol. Bogotá 2007. Tesis para obtener el título de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Nacional
103. Monck, J.R., and Fernandez, J.M. The fusion pore and mechanisms of biological membrane fusion. *Current. Opin. Cell. Biol.* 1996; (8):524-533.
104. Young-Yun, K. et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *J. Cell Biochem.* 1999; (72): 67-80
105. Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, Cameron PU, Holloway WR, Gough TJ,. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL). *Clin. Sci.* 2000; (99): 133–140.

106. Kanzaki H, Chiba M, Sato A, Miyagawa A, Arai K, Nukatsuka S, et al. Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Stress Induce Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand Up-Regulation via Prostaglandin E2 Synthesis. *J Dent Res*. 2006; (85):457-62.
107. Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K. Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J. Dent Res* 2007; (86): 623-628.
108. Ichimiya H¹, Takahashi T, Ariyoshi W, Takano H, Matayoshi T, Nishihara T. Compressive mechanical stress promotes osteoclast formation through RANKL expression on synovial cells. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod*. 2007; (103): 334-341.
109. Rubin J, Murphy T.C, Fan X, Goldschmidt M, Taylor W.R. Activation of extracellular signal-regulated kinase is involved in mechanical strain inhibition of RANKL expression in bone stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2002; (17): 1452–1460.
110. Rubin J, Murphy TC, Zhu L, Roy E, Nanes MS, Fan X.. Mechanical strain differentially regulates endothelial nitric-oxide synthase and receptor activator of nuclear kappa B ligand expression via ERK1/2 MAPK. *J Biol Chem*, 2003; (278):34018–34025.
111. Kook SH, Son YO, Hwang JM, Kim EM, Lee CB, Jeon YM et al. Mechanical force inhibits osteoclastogenic potential of human periodontal ligament fibroblasts through OPG production and ERK-mediated signaling. *J. Cellular Biochem*, 2009; (106): 1010-1019
112. Xu XY, Guo C, Yan YX, Guo Y, Li RX, Song M, et al. Differential effects of mechanical strain on osteoclastogenesis and osteoclast-related gene expression in RAW264. 7. *Cells. Mol Med Rep*, 2012;(6): 409-415.
113. Krishnan V, Davidovitch Z.. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006; (129):469.e1-32.
114. Gu G, Lemery SA, King GJ. Effect of appliance reactivation after decay of initial activation on osteoclasts, tooth movement, and root resorption. *Angle Orthod*. 1999 ;(69):515-22.
115. Rody WJ Jr, King GJ, Gu G. Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001; (120):477-89.

116. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci.* 2003; (60):6-20
117. Toker H, Ozdemir H, Balci H, Ozer H. N-acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Periodontal Res.* 2012; (47):793-9
118. N-acetylcysteine Introduction. *Alternative Medicine Review.* Volume 5, Number 5. 2000. Disponible en: <http://www.altmedrev.com/publications/5/5/467.pdf>